

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 630**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2010 PCT/GB2010/000213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10703194 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2393831**

54 Título: **OmCI modificado como inhibidor del complemento**

30 Prioridad:

05.02.2009 WO PCT/GB2009/000311
20.04.2009 GB 0906779

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2016

73 Titular/es:

NATURAL ENVIRONMENT RESEARCH COUNCIL
(100.0%)
Polaris House North Star Avenue
Swindon SN2 1EU

72 Inventor/es:

NUNN, MILES, A.;
LEA, SUSAN, M. y
ROVERSI, PIETRO, C.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 589 630 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).

OmCI modificado como inhibidor del complemento

DESCRIPCIÓN

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones novedosas útiles en el tratamiento de enfermedad y afecciones mediadas por el complemento y en particular a inhibidores del complemento específicos derivados de garrapata modificados y a su uso para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por el complemento.

10

Antecedentes de la invención

El complemento es un sistema de defensa inmunitario innato importante. Participa en la protección del cuerpo de agentes extraños y en el proceso de inflamación. Hay más de 30 proteínas del suero y de la superficie celular que son conocidas por participar en la función y regulación del sistema del complemento.

15

Hay tres vías de activación del complemento: la vía clásica; la vía alternativa y la vía de lectina. La vía clásica se activa por complejos de IgM o IgG o hidratos de carbono. La vía alternativa se activa por no auto-superficies y endotoxinas bacterianas. La vía de lectina se activa por la unión de lectina de unión a manano (MBL) a manosa sobre la superficie de un patógeno. Las tres vías del complemento comprenden cascadas paralelas en las que formas similares de la C3-convertasa y una C5-convertasa se escinden y activan componentes C3 y C5 respectivamente, creando C3a y C3b y C5a y C5b.

20

Estos fragmentos del complemento activo son responsables de mediar en una amplia gama de efectos inmunitarios. C3a y C5a desencadenan la desgranulación de mastocitos y aumentan la permeabilidad vascular y la contracción de músculo liso. C5a también actúa de proteína quimiotáctica y recluta a células inmunitarias. C3b osoniza y aumenta la fagocitosis de patógenos. C5b es responsable de iniciar la formación del complejo de ataque a membrana (MAC).

25

La activación de las tres vías del complemento se regula cuidadosamente bajo condiciones fisiológicas en individuos sanos. Debido a la función importante del complemento en el sistema inmunitario y las consecuencias de la activación inapropiada del complemento, hay múltiples mecanismos que actúan juntos para regular la activación de la vía del complemento. Los principales reguladores de las vías del complemento son las proteínas de control del complemento. Éstas se expresan en el plasma a mayores concentraciones que los propios componentes del complemento. Algunas proteínas de control del complemento se expresan sobre la superficie de las propias células del cuerpo, previniendo así que estas células sean inapropiadamente elegidas como diana por el complemento. Adicionalmente, muchos de los componentes del complemento activo, tales como C3a y C5a, tienen semividas muy cortas y, por lo tanto, solo son activos en el plasma durante cortos periodos después de su activación.

30

35

El fallo de los mecanismos de control que regulan la activación del complemento puede producir daño a los propios tejidos del cuerpo. El fallo de los mecanismos de control del complemento participa en muchas afecciones patológicas y enfermedades. Las afecciones que se sabe que implican a una falta de control de las vías del complemento incluyen degeneración macular senil (AMD), enfermedad de Alzheimer, encefalomiелitis alérgica, alotrasplante, artritis de diversos tipos que incluye artritis reumatoide, asma, síndrome disneico del adulto, lesiones por quemadura, cáncer, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, glomerulonefritis, anemia hemolítica, hemodiálisis, angioedema hereditario, nefropatía membranosa idiopática, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), lesiones por isquemia-reperusión, enfermedad de las neuronas motoras, fallo multiorgánico, esclerosis múltiple, miastenia grave, infarto de miocardio, nefritis, penfigoide, derivación postcardiopulmonar, psoriasis, choque séptico, aborto espontáneo, accidente cerebrovascular, lupus eritematoso sistémico, uveítis, síndrome de extravasación vascular y xenotrasplante.

40

45

Debido a la importancia de la cuidadosa regulación de las vías del complemento, ha habido mucho interés en el desarrollo de inhibidores del complemento para su uso en la prevención o tratamiento de afecciones y enfermedades que se sabe que implican un fallo en regular el complemento. La investigación se ha centrado en el desarrollo de anticuerpos para componentes del complemento específicos, aptámeros de ARN y moléculas que se dirigen a los receptores del complemento.

50

55

Los eicosanoides son una familia de mediadores de lípidos biológicamente activos oxigenados que se derivan del araquidonato de ácidos grasos de 20 carbonos (AA) e inducen numerosos efectos sobre los diversos tipos de células y órganos. Los leucotrienos (LK) son una subfamilia de eicosanoides que tienen múltiples efectos, que incluyen regulación del tono vascular y permeabilidad de los capilares y las vénulas, contracción o relajación de músculo (cisteinil LK), control del crecimiento y o diseminación de células malignas (Schwartz et al., 2005; Aya, 2006), y activación de leucocitos, en particular en afecciones autoinmunitarias e inflamatorias (LK, HETE) (Samuelsson, 1983; Kim et al., 2006).

60

El leucotrieno B₄ (LTB₄) es el eicosanoide quimiotáctico y quimiocinético más poderoso descrito y promueve la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular mediante la regulación por incremento de integrinas (Hoover et al.,

65

1984). También es un secretagogo completo para los neutrófilos, induce su agregación y aumenta la permeabilidad microvascular. LTB₄ recluta y activa linfocitos citolíticos espontáneos, monocitos y eosinófilos. Aumenta la formación de radicales superóxido (Harrison y Murphy, 1995) y modula la expresión génica que incluye la producción de varias citocinas proinflamatorias y mediadores que pueden aumentar y prolongar la inflamación de tejido (Ford-Hutchinson, 1990; Showell *et al.*, 1995). LTB₄ también tiene funciones en la inducción y la gestión de respuestas inmunitarias adaptativas. Por ejemplo, la regulación del tráfico de células dendríticas hacia ganglios linfáticos drenantes (Klaas *et al.*, 2005; Del Prete *et al.*, 2007), producción de IL-13 por citocinas Th2 de linfocitos T de pulmón (Miyahara *et al.*, 2006), reclutamiento de linfocitos T CD8+ efectores específicos de antígeno (Taube *et al.*, 2006) y activación y proliferación de linfocitos B humanos (Yamaoka *et al.*, 1989).

El documento WO2004/106369 describe un inhibidor del complemento (C) derivado de garrapata blanda (*Ornithodoros moubata*) OmCI que inhibe tanto las vías clásicas como alternativas del complemento por la unión directa al componente del complemento C5 (Nunn *et al.*, 2005). OmCI se deriva de las glándulas salivales de artrópodos hematófagos. Ha demostrado potencial terapéutico (Hepburn *et al.*, 2007). Se ha mostrado recientemente que OmCI se une a eicosanoides, en particular LK, especialmente LTB₄.

Sumario de la invención

Se ha mostrado ahora que OmCI puede modificarse para reducir o eliminar la actividad de unión a leucotrieno/hidroxi-eicosanoide (LK/E). En particular, los presentes inventores han mostrado que modificar el polipéptido de OmCI en residuos específicos reduce o elimina la actividad de unión de LTB₄. Por tanto, la presente invención se refiere a polipéptidos de OmCI modificados que carecen de actividad de unión de LTB₄ y a polinucleótidos que codifican tales polipéptidos de OmCI modificados. En particular, la invención se refiere a polipéptidos de OmCI que carecen de actividad de unión de LTB₄ debido a la modificación de residuos específicos dentro del bolsillo de unión de OmCI y a polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. La invención se refiere además a polipéptidos de OmCI que se unen a componentes del complemento y no a LTB₄. Tales polipéptidos de OmCI modificados, o polinucleótidos que codifican tales polipéptidos de OmCI modificados, actúan de inhibidores del complemento y pueden usarse en la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por el complemento, sin interferir con la función de LTB₄.

Así, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄.

Según una realización preferida de la presente invención, el polipéptido de OmCI comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄;
- (b) una secuencia de aminoácidos de variante que tienen al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄;
- (c) una secuencia de aminoácidos de variante de SEQ ID NO: 2 que tiene al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos entre los restos de aminoácidos 19 a 168 de SEQ ID NO: 2 y que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄; o
- (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a), (b) o (c) que carece de actividad de unión de LTB₄.

La invención proporciona además polinucleótidos que codifican los polipéptidos de OmCI de la invención.

La invención proporciona además vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención.

La invención proporciona además células huésped que comprenden los polinucleótidos o vectores de la invención.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄; un polinucleótido que codifica un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄; o un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄ y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción de las figuras

Fig. 1: Detalle de la estructura cristalina de OmCI expresado bacteriano (bOmCI) unido a ácido palmitoleico (centro de la figura).

Fig. 2: Inmunoensayo enzimático (EIA) que muestra la unión de 12(S)-HETE por 41,2 µg de bOmCI, pg/ml de 12(S)-HETE en disolución tras 20 min de preincubación de 12500 µg/ml de 12(S)-HETE con o sin PBS, OmCI, RaHBP2.

Fig. 3: Espectros de absorción de bOmCI y LTB₄. (A) LTB₄ en disolución (línea superior) antes de la adición de OmCI, y re-medición de la misma disolución (línea inferior) después de la adición, luego eliminación del complejo de bOmCI:LTB₄ por ultrafiltración (B) complejo de bOmCI:LTB₄ (línea superior) y bOmCI (línea inferior) solo después de la concentración a 200 µl por ultrafiltración.

Fig. 4: Detalle de la estructura cristalina de bOmCI unido a LTB₄ (centro de la figura). Se muestran átomos de oxígeno en LTB₄, en el grupo carboxi y grupos hidroxilo en C-5 y C-12. Estos grupos forman enlaces de hidrógeno (líneas de puntos) con aminoácidos en la cavidad de unión (véase el texto del ejemplo 3).

Fig. 5: Análisis de cromatografía de gases de ácidos grasos presentes en OmCI recombinante expresado en bacterias. La identidad del ácido palmítico y eláidico se confirmó por espectrometría de masas y comparación con patrones de referencia.

Fig. 6: El OmCI mutante (yOmCI-F36W y yOmCI-G59W) con el bolsillo de unión bloqueado por el gran aminoácido triptófano muestra significativamente menos unión a LTB₄ que yOmCI no mutante en un intervalo de concentraciones de proteína.

Fig 7: Ensayo hemolítico de la vía clásica que compara RaHBP2 (lipocalina de garrapata de control negativo que no inhibe el complemento) con OmCI recombinante no mutante y yOmCI-F36W mutante y yOmCI-G59W que no se unen a LTB₄.

Fig 8: yOMCI-F36W mutante y yOMCI-G59W con el bolsillo de unión bloqueado por el gran aminoácido triptófano (W) inhibieron la vía clásica de activación del complemento con igual potencia a OMCI no mutante.

Fig. 9: Unión de LTB₄ radiomarcado por OMCI solo y en complejo con C5 humano es (a) saturable y (b) tiene cinética de unión similar. El panel (a) es representativo de tres experimentos y muestra datos sin procesar. El panel (b) es representativo de dos experimentos y muestra valores de c.p.m después de la resta de las c.p.m de control negativo promedio (n = 16). Se muestran funciones de la línea de regresión logarítmica: OMCI, $y = 134,67\ln(x) + 521,6$, $R^2 = 0,98$; OMCI:hC5, $y = 132,87\ln(x) + 479,2$, $R^2 = 0,97$.

Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de polinucleótidos y de proteínas codificada de OmCI de *O. moubata*.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de OmCI *O. moubata*.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 19 a 168 mostrados en SEQ ID NO: 2 y es la secuencia de aminoácidos de OmCI sin las primeras secuencias de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 2, que es una secuencia señal.

SEQ ID NO: 4 y 5 son la secuencia de polinucleótidos y de proteínas codificada y la secuencia de proteínas, respectivamente, de OmCI, modificadas para cambiar Asn78 a Gln y Asn 102 a Gln, con un cambio de codón de AAT y AAC respectivamente a CAA, para la expresión en levadura para evitar hiperglicosilación.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de polinucleótidos y de proteínas codificada de OmCI-F36W mutante de *O. moubata*

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos OmCI-F36W mutante de *O. moubata*.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 19 a 168 mostrados en SEQ ID NO: 6 y es la secuencia de aminoácidos de OmCI-F36W mutante sin las primeras secuencias de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 6, que es una secuencia señal.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de polinucleótidos y de proteínas codificada de OMCI-G59W mutante de *O. moubata*

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos OMCI-G59W mutante de *O. moubata*.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 19 a 168 mostrados en SEQ ID NO: 9 y es la secuencia de aminoácidos de OMCI-G59W mutante sin las primeras secuencias de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 9, que es una secuencia señal.

Así, la presente invención proporciona un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄ o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido de OmCI. La actividad de unión de LTB₄ como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de OmCI no mutante para unirse a leucotrienos y hidroxieicosanoides que incluyen, pero no se limitan a, LTB₄, isoleucotrienos B4 y cualquier derivado hidroxilado de los mismos, HETE, HPETE y EET. La proteína OmCI puede ser un inhibidor del complemento derivado de garrapata, aislado de la saliva de *O. moubata* o puede ser un equivalente funcional del mismo, que incluye homólogos del mismo y fragmentos de cualquiera de ellos.

La proteína OmCI de la presente invención es preferentemente OmCI de *O. moubata*. Esta proteína se aisló por primera vez de las glándulas salivales de la garrapata y se ha encontrado que inhibe las vías clásicas y alternativas del complemento. La secuencia de aminoácidos para esta proteína se muestra en SEQ ID NO: 2. Un polipéptido según la invención puede incluir la secuencia completa mostrada en SEQ ID NO: 2, que se ha modificado para eliminar específicamente la actividad de unión de LTB₄. Alternativamente, se proporciona el polipéptido que no incluye los primeros 18 aminoácidos de la secuencia de proteínas que forman una secuencia señal que se ha modificado para eliminar específicamente la actividad de unión de LTB₄. Por consiguiente, un polipéptido según la invención puede ser aquel de SEQ ID NO: 3, que tiene los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 2, adicionalmente modificados para eliminar la actividad de unión de LTB₄.

Según la invención se proporciona una variante, tal como un homólogo, o fragmento de la proteína OmCI de *O. moubata*, que también carece de actividad de unión de LTB₄. Los homólogos pueden incluir parálogos y ortólogos de la secuencia de OmCI que se expone en SEQ ID NO: 2 o 3, que incluyen, por ejemplo, la secuencia de proteínas de OmCI de otras especies de garrapata 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*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, *I. hexagonus*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *Ornithodoros erraticus*, *O. moubata moubata*, *O. m. porcinus* y *O. savignyi*, que se han modificado para eliminar específicamente la actividad de unión de LTB₄. El término "homólogo" también pretende incluir la secuencia de proteínas de OmCI de especies de mosquito, que incluyen aquellas de los géneros *Culex*, *Anopheles* y *Aedes*, particularmente *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*; especies de pulga, tales como *Ctenocephalides felis* (la pulga del gato); moscas de caballo; moscas de la arena; moscas negras; moscas tsé-tsé; piojos; ácaros; sanguijuelas; y platelmintos.

En una realización, el polipéptido de OmCI comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄;
- (b) una secuencia de aminoácidos de variante que tienen al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄;
- (c) una secuencia de aminoácidos de variante de SEQ ID NO: 2 que tiene al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos entre los restos de aminoácidos 19 a 168 de SEQ ID NO: 2 y que se ha modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄; o
- (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a), (b) o (c) que carece de actividad de unión de LTB₄.

Los polipéptidos de variante son aquellos para los que la secuencia de aminoácidos varía de aquellos en SEQ ID NO: 2 o 3, pero que retienen el mismo carácter esencial que los polipéptidos de OmCI de la invención y que se han modificado para eliminar la actividad de unión de LTB₄.

Normalmente, los polipéptidos con más de aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 % o el 65 % de identidad, preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y particularmente preferentemente al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 3, además de la una o más modificaciones de eliminación de la actividad de unión de LTB₄ en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipéptidos de OmCI modificados de la invención, se consideran variantes de la proteína. Tales variantes pueden incluir variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de proteínas, en tanto que el péptido mantenga la actividad de polipéptidos de OmCI de la invención, y se modifiquen adicionalmente para eliminar la actividad de unión de LTB₄. La identidad de variantes de SEQ ID NO: 3 puede medirse con respecto a una región de al menos 50, al menos 100, al menos 130 o al menos 140 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, o más preferentemente con respecto a la longitud completa de SEQ ID NO: 3.

La identidad de aminoácidos puede calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular homología (por ejemplo, usado en sus parámetros por defecto) (Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, pág. 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular homología o alinear secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes (normalmente en sus parámetros por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F et al. (1990) *J Mol Biol* 215:403-10).

El software para realizar los análisis por BLAST está públicamente disponible del Centro nacional para información biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero el par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud *W* en la secuencia de búsqueda que tanto coinciden como satisfacen alguna puntuación *T* umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. *T* se denomina el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., arriba). Estas palabras comunes vecinas iniciales actúan de semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que las contienen. Las palabras comunes se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para poder aumentar en la medida de lo posible la puntuación de alineamiento acumulado. Las extensiones para las palabras comunes en cada dirección se detienen cuando: las puntuaciones de alineamiento acumuladas se encuentran fuera de la cantidad *X* de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación acumulada; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros *W*, *T* y *X* del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (*W*) de 11, los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) (*B*) de 50, esperanza (*E*) de 10, *M*=5, *N*=4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma mínima (P(N)) que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de polinucleótidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma mínima en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es inferior a aproximadamente 1, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Las secuencias de variante normalmente se diferencian por al menos 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, pueden hacerse de 1 a 50, 2 a 40, 3 a 30 o 5 a 20 sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones. Las sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, por ejemplo según la Tabla 1. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden estar sustituidos entre sí.

Tabla 1: Propiedades de las diferentes cadenas laterales de aminoácidos

ALIFÁTICO	No-polar	G A P
		I L V
	Polar - descargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

El fragmento del polipéptido de OmCI usado en la invención normalmente tiene al menos 50, por ejemplo al menos 80 o más aminoácidos de longitud, hasta 90, 100, 120, 130 o 140 aminoácidos de longitud, en tanto que retenga la falta de actividad de unión de LTB₄ del polipéptido de OmCI modificado. En una realización preferida, el fragmento del polipéptido de OmCI retiene la actividad de inhibidor del complemento mostrada por OmCI de *O. moubata*.

Los polipéptidos de OmCI de la presente invención, que incluyen polipéptidos de variante, tales como homólogos, o fragmentos de los mismos, carecen de actividad de unión de LTB₄. La actividad de unión de LTB₄ puede eliminarse por la modificación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de OmCI. La actividad de unión de LTB₄ también puede eliminarse por la modificación de la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica el polipéptido de OmCI de la invención que produce una modificación apropiada en el polipéptido de OmCI codificado.

El polipéptido de OmCI de la presente invención puede modificarse para carecer de actividad de unión de LTB₄ por la mutación de residuos específicos dentro de la secuencia de aminoácidos de OmCI. En una realización, la mutación de restos de aminoácidos específicos es no conservativa, de forma que uno o más restos de aminoácidos del polipéptido de OmCI no mutante están sustituidos con un resto de aminoácido de diferente polaridad. Por ejemplo, según la Tabla 1, los aminoácidos en diferentes bloques en la tercera columna pueden estar sustituidos entre sí. En otra realización, el OmCI puede modificarse sustituyendo uno o más restos de aminoácidos del polipéptido de OmCI no mutante por un resto de aminoácido que comprende una gran cadena lateral para aumentar la interferencia estérica para prevenir la unión a LTB₄.

En una realización, la actividad de unión de LTB₄ se elimina por la modificación de aminoácidos dentro del bolsillo de unión de LTB₄ del polipéptido de OmCI. Los aminoácidos que probablemente van a requerirse particularmente para la unión de LTB₄ incluyen (con referencia a SEQ ID NO. 2): Phe36, Arg54, Leu57, Gly59, Val72, Met74, Phe76, Thr85, Trp87, Phe89, Glen 105, Arg107, His119, Asp121, Trp133. En otra realización al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 de estos aminoácidos están mutados para eliminar la actividad de unión de LTB₄. En una realización preferida, al menos una mutación dentro de OmCI está seleccionada de Phe36Trp y Gly59Trp. En otra realización, el polipéptido de OmCI modificado comprende tanto las mutaciones Phe36Trp como Gly59Trp.

En otra realización, la actividad de unión de LTB₄ se elimina por la modificación de aminoácidos fuera del bolsillo de unión de LTB₄, en el que la modificación de dichos aminoácidos produce un cambio conformacional en el polipéptido de OmCI, dentro de o fuera del sitio de unión de LTB₄, produciendo la pérdida de actividad de unión de LTB₄.

Los polipéptidos de variante de OmCI, tales como homólogos, o fragmentos de los mismos de la presente invención, también se modifican para carecer de actividad de unión de LTB₄. Tales variantes, además de las variaciones de secuencia tratadas anteriormente, se modifican adicionalmente en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipéptidos de OmCI modificados de la invención. Los aminoácidos equivalentes a las posiciones especificadas en OmCI pueden determinarse alineando las secuencias de aminoácidos del bolsillo de unión de LTB₄ de OmCI y la variante e identificando los restos de aminoácidos correspondientes.

Métodos para determinar si un polipéptido de OmCI modificado particular tiene actividad de unión de LK/E reducida o carece de ella incluyen inmunoensayos enzimáticos, dispersión de la luz, espectrometría de masas, resonancia de plasmones superficiales, absorción UV, ensayos de unión a radioligando o ligando fluorescentemente marcado y cristalografía. Tales métodos serían conocidos para la persona experta en la materia. Ejemplos de métodos específicos para determinar la unión a LTB₄ de polipéptidos de OmCI se encuentran en la sección de ejemplos.

Normalmente, un polipéptido de OmCI modificado según la presente invención tiene actividad de unión de LTB₄ reducida, o carece de esta actividad. Normalmente, la afinidad de unión para LTB₄ se reduce al menos el 50 % en comparación con OmCI no modificado, por ejemplo, se reduce al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % o se elimina.

Los polipéptidos de la invención también pueden proporcionarse como una proteína de fusión que comprende un polipéptido de OmCI genética o químicamente fusionado con otro péptido. El fin del otro péptido puede ser ayudar en la detección, expresión, separación o purificación de la proteína. Alternativamente, la proteína puede fusionarse con un péptido tal como un péptido Fc para aumentar la semivida en circulación de la proteína. Ejemplos de otros componentes de fusión incluyen beta-galactosidasa, glutatión-S-transferasa o luciferasa.

Los polipéptidos usados en la invención pueden modificarse químicamente, por ejemplo, modificarse post-traduccionalmente. Por ejemplo, pueden glucosilarse, pegilarse, fosforilarse o comprender restos de aminoácidos modificados. Pueden modificarse mediante la adición de restos de histidina para ayudar en su purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover la inserción dentro de la membrana celular. Tales polipéptidos modificados entran dentro del alcance del término "polipéptido" usado en el presente documento.

Un polipéptido para su uso según la invención carece de actividad de unión de LTB₄. El OmCI no mutante tiene una tendencia a unirse a cualquier ácido graso no cíclico de entre 16 y 20 átomos de carbono de longitud. Ciertos ácidos grasos, en particular LTB₄, se unen más fuertemente que otros. Otros ácidos grasos a los que el polipéptido de la invención puede unirse incluyen ácido araquidónico, 12-epi LTB₄, 20-hidroxi LTB₄ y los hidroxieicosanoides que incluyen ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (HETE) y ácido 12(S)-hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE). La presencia o ausencia de actividad de unión de LTB₄ o actividad de unión a otros ácidos grasos del polipéptido puede determinarse usando técnicas tales como aquellas tratadas anteriormente. Un ensayo de unión tal se ejemplifica en los ejemplos. En algunas realizaciones, puede ser preferible seleccionar un polipéptido que carece preferentemente de actividad de unión por un ácido graso específico, tal como LTB₄. Tal falta preferencial de actividad de unión puede determinarse por ensayos adecuados, por ejemplo, ensayos de competición como se ejemplifica en los ejemplos.

Según algunos aspectos de la invención, preferentemente, un polipéptido para su uso según la invención retiene la actividad del inhibidor del complemento mostrada por OmCI de *O. moubata*. Preferentemente, el polipéptido inhibe tanto las vías clásicas como alternativas de activación del complemento. Por inhibir se indica que el efecto de las vías alternativas y clásicas de activación del complemento se reduce. La capacidad de una molécula para reducir el efecto de la vía clásica del complemento y la vía alternativa del complemento puede determinarse por ensayos hemolíticos estándar conocidos en la técnica, tales como aquellos descritos en Giclas et al. (1994) y en el documento WO2004/106369. Preferentemente, la presencia de un polipéptido inhibidor del complemento de la invención reduce la lisis de glóbulos rojos en ensayos hemolíticos estándar para las vías clásicas y alternativas de activación del complemento al menos el 20 % en comparación con un ensayo estándar en ausencia de un polipéptido inhibidor del complemento, más preferentemente al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o el 80 %.

Preferentemente, el polipéptido inhibidor del complemento inhibe la escisión de C5 por la C5 convertasa en la vía clásica y la C5 convertasa en la vía alternativa. La conversión de C5 a C5b por C5 convertasa se produce en tanto la vía alternativa del complemento como la vía clásica del complemento. La C5 convertasa en la vía clásica es C4b3b2a y la C5 convertasa en la vía alternativa es C3b2Bb. La inhibición de la escisión de C5 por ambas de estas C5 convertasas inhibe así tanto las vías clásicas como alternativas de activación del complemento. La capacidad de una molécula para inhibir la escisión de C5 por las C5 convertasas de las vías clásicas y alternativas puede determinarse por ensayos *in vitro* estándar. Preferentemente, la presencia de un polipéptido inhibidor del complemento reduce la escisión de C5 por las C5 convertasas de las vías clásicas y alternativas al menos el 20 % en comparación con un ensayo estándar en ausencia de un polipéptido inhibidor del complemento, más preferentemente al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o el 80 %. Preferentemente, la actividad del inhibidor del complemento de los polipéptidos de las invenciones inhibe la escisión de C5 por las C5 convertasas de las vías clásicas y alternativas de una variedad de especies de mamífero.

Polipéptidos para su uso en la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con el fin previsto del polipéptido y todavía se considerarán como sustancialmente aislados. Un polipéptido para su uso en la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá el polipéptido en una preparación en la que más del 50 %, por ejemplo más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

También pueden prepararse polipéptidos para su uso en la invención como fragmentos de tales polipéptidos aislados. Además, los polipéptidos de OmCI también pueden prepararse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, un polipéptido de OmCI recombinante puede producirse transfectando células de mamífero, fúngicas, bacterianas o de insecto en cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido operativamente ligado a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo y purificando el polipéptido de OmCI producido por las células.

La secuencia de aminoácidos de polipéptidos para su uso en la invención puede modificarse para incluir aminoácidos que no existen de forma natural o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, tales aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse siguiendo cualquier producción sintética o recombinante.

Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden producirse usando D-aminoácidos. En tales casos, los aminoácidos se enlazarán en la secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es convencional en la materia para producir tales polipéptidos.

Se conocen en la técnica varias modificaciones de la cadena lateral y puede hacerse a las cadenas laterales de los polipéptidos de OmCI, a condición de que los polipéptidos retengan la actividad de OmCI, pero carezcan de la actividad de unión de LTB₄.

Polinucleótidos

La presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido de OmCI que carece de actividad de unión de LTB₄. En una realización, el polinucleótido de la presente invención codifica la proteína OmCI de *O. moubata*. La secuencia de nucleótidos que codifica OmCI de *O. moubata* se muestra en SEQ ID NO: 1. Un polinucleótido según la invención puede incluir la secuencia completa mostrada en SEQ ID NO: 1 que se ha modificado para eliminar específicamente la actividad de unión de LTB₄ del polipéptido codificado.

Según la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una variante, tal como un homólogo, o fragmento de la proteína OmCI de *O. moubata*, que también carece de actividad de unión de LTB₄. Pueden hacerse sustituciones degeneradas adicionales y/o pueden hacerse sustituciones que producirían una sustitución de aminoácidos conservativa cuando la secuencia modificada se tradujera, por ejemplo como se muestra en la Tabla 1 anterior. Tales variantes codificadas se tratan anteriormente y comprenden adicionalmente modificaciones en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipéptidos de OmCI modificados de la invención.

Un polinucleótido de la invención, que incluye polinucleótidos que codifican polipéptidos de variante, tales como homólogos, o fragmentos, puede normalmente hibridarse con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1 a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede producirse, por ejemplo, debido a otros ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1 normalmente es al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, tan intenso como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, por radiomarcado de la sonda, por ejemplo con ³²P. Normalmente puede lograrse hibridación selectiva usando condiciones de rigurosidad de media a alta. Sin embargo, tal hibridación puede llevarse a cabo bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Por ejemplo, si se requiere rigurosidad alta, condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C a 65 °C. Si se requiere rigurosidad más baja, condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.

La secuencia codificante de SEQ ID NO: 1 puede modificarse por sustituciones de nucleótidos, por ejemplo, de 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones, además de codificar una o más modificaciones de eliminación de actividad de unión de LTB₄ en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipéptidos de OmCI modificados de la invención. El polinucleótido de SEQ ID NO: 1 puede modificarse alternativamente o adicionalmente por una o más inserciones y/o deleciones y/o por una extensión en cualquiera o ambos extremos. También pueden incluirse secuencias adicionales tales como secuencias señal o secuencias que codifican otro péptido o proteína para ayudar en la detección, expresión, separación o purificación de la proteína o que codifican un péptido tal como un péptido Fc para aumentar la semivida en circulación de la proteína. Ejemplos de otros componentes de fusión incluyen beta-galactosidasa, glutatión-S-transferasa o luciferasa.

Una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de SEQ ID NO: 1 generalmente tendrá, además de codificar una o más de las modificaciones de eliminación de actividad de unión de LTB₄ en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipéptidos de OmCI modificados de la invención, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias con la secuencia codificante de SEQ ID NO: 3 con respecto a una región de al menos 20, preferentemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, al menos 60, al menos 100, al menos 200, al menos 420, o lo más preferentemente con respecto a la longitud

completa de SEQ ID NO: 1 o la longitud de SEQ ID NO: 1 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1. La identidad de secuencias puede determinarse por cualquier método adecuado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

5 Puede usarse cualquier combinación de los grados anteriormente mencionados de identidad de secuencias y tamaños mínimos para definir polinucleótidos de la invención, prefiriéndose las combinaciones más rigurosas (es decir, mayor identidad de secuencias con respecto a longitudes más largas). Así, por ejemplo, un polinucleótido que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencias con respecto a 60, preferentemente con respecto a 100 nucleótidos, forma un aspecto de la invención, como un polinucleótido que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencias con respecto a 420 nucleótidos.

10 Los fragmentos de polinucleótidos preferentemente tendrán al menos 20, por ejemplo al menos 25, al menos 30 o al menos 50 nucleótidos de longitud. Normalmente serán de hasta 100, 150, 250 o 400 nucleótidos de longitud. Los fragmentos pueden ser más largos de 400 nucleótidos de longitud, por ejemplo hasta algunos nucleótidos, tales como cinco, diez o quince nucleótidos, de corto de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1.

15 Los polinucleótidos de OmCI de la presente invención, que incluyen los polinucleótidos que codifican polipéptidos de variante, tales como homólogos, o fragmentos, codifican todos polipéptidos que tienen actividad de unión de LTB₄ reducida o carecen de ella. Tales variantes de polinucleótidos, además de las variaciones de secuencia tratadas anteriormente, se modifican adicionalmente en posiciones equivalentes a aquellas encontradas en los polipolnucleótidos de OmCI modificados de la invención, de manera que codifican polipéptidos que carecen de actividad de unión de LTB₄. Los ácidos nucleicos equivalentes a las posiciones especificadas en OmCI pueden determinarse alineando las secuencias de ácidos nucleicos de OmCI modificado y la variante e identificando los restos de ácidos nucleicos correspondientes.

20 La actividad de unión de LTB₄ puede eliminarse por la modificación de la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica el polipéptido de OmCI de la invención que produce una modificación apropiada en el polipéptido de OmCI codificado.

25 El polinucleótido de OmCI de la presente invención puede modificarse para mutar residuos específicos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de OmCI codificado, produciendo la eliminación de actividad de unión de LTB₄. En una realización pueden hacerse sustituciones no degeneradas en el polinucleótido de la invención, que producirían una sustitución de aminoácidos no conservativa cuando la secuencia modificada se traduce, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 1 anterior.

30 En una realización, la actividad de unión de LTB₄ se elimina por la modificación del polinucleótido de la invención para mutar aminoácidos dentro del bolsillo de unión de LTB₄ del polipéptido de OmCI codificado. Los aminoácidos que probablemente van a requerirse particularmente para la unión de LTB₄ incluyen (con referencia a SEQ ID NO. 2): Phe36, Arg 54, Leu57, Gly59, Val72, Met74, Phe76, Thr85, Trp87, Phe89, Gln105, Arg107, His119, Asp121, Trp133. En otra realización, el polinucleótido de la invención se modifica de manera que el polipéptido de OmCI codificado mute al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 de estos aminoácidos para eliminar la actividad de unión de LTB₄. En una realización preferida, el polinucleótido de la invención se modifica de manera que al menos una mutación dentro del polipéptido de OmCI codificado se seleccione de Phe36Trp y Gly59Trp.

35 Un polinucleótido de la invención puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por el complemento. Normalmente, el polinucleótido es ADN. Sin embargo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser mono o bicatenario, y puede incluir dentro de él nucleótidos sintéticos o modificados.

40 Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para aquellos expertos en la materia. También pueden clonarse por técnicas convencionales. Los polinucleótidos normalmente se proporcionan en forma aislada y/o purificada.

45 En general, se producirán polinucleótidos cortos por medios sintéticos, que implican una fabricación escalonada de la secuencia de ácidos nucleicos deseada de un nucleótido cada vez. Las técnicas para llevar a cabo esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la materia.

50 Generalmente se producirán polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para una región del gen OmCI que se desea clonar, poniendo los cebadores en contacto con el ADN obtenido de una célula de artrópodo que realiza una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo, purificando la mezcla de reacción sobre un gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

55

Tales técnicas pueden usarse para obtener toda o parte de la secuencia del gen OmCI descrita en el presente documento. Aunque en general las técnicas mencionadas en el presente documento son muy conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook *et al.* (1989).

5 Los polinucleótidos de OmCI como se describen en el presente documento tienen utilidad en la producción de los polipéptidos para su uso en la presente invención, que pueden tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos pueden usarse como agentes terapéuticos por derecho propio o pueden participar en la síntesis de proteínas recombinantes.

10 Los polinucleótidos para su uso en la invención normalmente se incorporan en un vector recombinante replicable. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por tanto, pueden prepararse polinucleótidos para su uso en la invención introduciendo un polinucleótido de OmCI en un vector replicable, introduciendo el vector dentro de una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped en condiciones que provoquen la replicación del vector. La célula huésped puede, por ejemplo, ser una célula de *E. coli*.

15 Preferentemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de OmCI. Tales vectores de expresión se construyen rutinariamente en la materia de la biología molecular y pueden, por ejemplo, implicar el uso de ADN de plásmido e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos apropiados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación, que pueden ser necesarias y que están posicionadas en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de proteínas. Las secuencias codificantes también pueden seleccionarse para proporcionar un uso de codón preferido adecuado para el organismo huésped que va a usarse. Otros vectores adecuados serían evidentes para las personas expertas en la técnica. A modo de ejemplo adicional a este respecto, los presentes inventores se refieren a Sambrook *et al.* (1989).

25 Preferentemente, un polinucleótido para su uso en la invención en un vector está operativamente ligado a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "operativamente ligado" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, "operativamente ligado" a una secuencia codificante está posicionada de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logre en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

30 Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de plásmido, virus o fago provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador de un promotor. El vector normalmente está adaptado para usarse *in vivo*.

35 Los promotores y otras señales de regulación de la expresión pueden seleccionarse para ser compatibles con la célula huésped para la que se diseña la expresión. Pueden usarse promotores de mamífero, tales como promotores de β -actina. Se prefieren especialmente los promotores específicos de tejido. También pueden usarse promotores virales, por ejemplo, la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del SV40, el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, promotores del VHS (tales como los promotores IE del VHS) o promotores del VPH, particularmente la región reguladora aguas arriba del VPH (URR). Los promotores virales están fácilmente disponibles en la técnica.

45 El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido que dan lugar a polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas a secuencias genómicas eucariotas, preferentemente secuencias genómicas de mamífero. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención dentro del genoma de células eucariotas por recombinación homóloga. En particular, puede usarse un vector plasmídico que comprende el casete de expresión flanqueado por secuencias virales para preparar un vector viral adecuado para administrar los polinucleótidos de la invención a una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores virales del herpes simple y retrovirus, que incluyen lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus VPH. Técnicas de transferencia génica que usan estos virus son conocidas para aquellos expertos en la materia. Pueden usarse vectores de retrovirus, por ejemplo, para integrar establemente el polinucleótido que da lugar al polinucleótido dentro del genoma del huésped. Por el contrario, los vectores de adenovirus defectuosos en la replicación siguen siendo episómicos y, por lo tanto, permiten la expresión transitoria.

Enfermedades y afecciones

60 OmCI no mutante es conocido por unirse a tanto moléculas del complemento como de LK/E tales como LTB₄. Los presentes inventores han encontrado que OmCI puede modificarse para eliminar específicamente la actividad de unión de LTB₄. Los presentes inventores han identificado residuos específicos dentro del bolsillo de unión de OmCI que pueden mutarse para eliminar la actividad de unión de LTB₄, pero no tienen efecto sobre la capacidad de OmCI para unirse a componentes del complemento. LTB₄ es el eicosanoide quimiotáctico y quimiocinético más poderoso descrito y promueve la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular mediante la regulación por incremento de integrinas. LTB₄ induce la agregación de neutrófilos y mediante una variedad de procesos desempeña una función

en la inflamación.

Así, la eliminación específica de actividad de unión de LTB₄ proporciona la oportunidad de usar tales polipéptidos y polinucleótidos de OmCI modificados que codifican tales polipéptidos de OmCI modificados para tratar enfermedades y afecciones mediadas por el complemento, sin interferir con la función de leucotrienos y eicosanoides en el sistema inmunitario.

Es deseable el tratamiento de afección (afecciones) patológica(s) en las que se inhibe la activación del complemento, pero LTB₄ u otros ácidos grasos que se unirían por OmCI no mutante se representan cuando:

- a) una enfermedad o afección está mediada por el complemento y LTB₄ no tiene función; o
- b) una enfermedad o afección está mediada por el complemento y si LTB₄, o los neutrófilos que recluta, tienen una función beneficiosa en vez de agravar la enfermedad o afección. Un ejemplo de un trastorno específico tal que puede tratarse según la presente invención es el tratamiento de cáncer en el que se ha mostrado recientemente que el bloqueo del receptor de C5a altera el crecimiento tumoral en un modelo animal, pero en el que los neutrófilos presentan actividad antitumoral mediante su reclutamiento a sitios de inflamación.
- c) un paciente, tal como un individuo inmunosuprimido, se beneficiaría de inhibir un mecanismo de defensa inmunitario (es decir, complemento) en vez de dos (complemento y LTB₄). Un ejemplo de un trastorno específico tal que puede tratarse según la presente invención es el tratamiento de cáncer en el que el paciente recibe quimioterapia y así tiene una respuesta migratoria de neutrófilos suprimida, haciéndolos susceptibles a infecciones bacterianas. Aquí, la presencia de LTB₄ reduce el riesgo de infecciones secundarias.

Ejemplos de trastornos específicos que pueden tratarse según la presente invención incluyen degeneración macular senil (AMD), enfermedad de Alzheimer, encefalomiелitis alérgica, alotrasplante, artritis de diversos tipos que incluyen artritis reumatoide, asma, síndrome disneico del adulto, lesiones por quemadura, cáncer, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, glomerulonefritis, anemia hemolítica, hemodiálisis, angioedema hereditario, nefropatía membranosa idiopática, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), lesiones por isquemia-reperfusión, enfermedad de las neuronas motoras, fallo multiorgánico, esclerosis múltiple, miastenia grave, infarto de miocardio, nefritis, penfigoide, derivación postcardiopulmonar, psoriasis, choque séptico, aborto espontáneo, accidente cerebrovascular, lupus eritematoso sistémico, uveítis, síndrome de extravasación vascular y xenotrasplante.

En una realización preferida, los trastornos específicos que pueden tratarse según la presente invención incluyen degeneración macular senil (AMD), enfermedad de Alzheimer, encefalomiелitis alérgica, alotrasplante, síndrome disneico del adulto, lesiones por quemadura, cáncer, dermatomiositis, glomerulonefritis, anemia hemolítica, hemodiálisis, angioedema hereditario, nefropatía membranosa idiopática, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), lesiones por isquemia-reperfusión, enfermedad de las neuronas motoras, fallo multiorgánico, miastenia grave, penfigoide, derivación postcardiopulmonar, choque séptico, aborto espontáneo, síndrome de extravasación vascular y xenotrasplante.

Terapia y profilaxis

En el presente documento se desvela el uso de polipéptidos y polinucleótidos de OmCI para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por el complemento. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico.

El polipéptido o polinucleótido de OmCI puede administrarse a un individuo con el fin de prevenir la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad o afección. En esta realización, el sujeto puede ser asintomático. El sujeto puede tener una predisposición genética a la enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido se administra a un individuo tal. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido de OmCI es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Preferentemente, el individuo que va a tratarse es humano.

El polipéptido o polinucleótido de OmCI puede administrarse al sujeto por cualquier medio adecuado. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse por vías enteral o parenteral tales como vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intrarterial, intramuscular, intraperitoneal, intrarticular, tópica u otras vías de administración apropiadas.

El polipéptido o polinucleótido de OmCI puede administrarse al sujeto de tal forma que dirija la terapia a un sitio particular.

La formulación de cualquiera de los polipéptidos y polinucleótidos mencionados en el presente documento dependerá de factores tales como la naturaleza del polipéptido o polinucleótido y la afección que va a tratarse. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse en una variedad de formas de dosificación. Pueden administrarse por vía oral (por ejemplo como comprimidos, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o aceitosas,

polvos dispersables o gránulos), por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica, tópica o por técnicas de infusión. El polipéptido o polinucleótido también puede administrarse como supositorios. Un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida para cada paciente particular.

5 Normalmente, el polipéptido o polinucleótido se formula para su uso con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y esto puede llevarse a cabo usando métodos rutinarios en la técnica farmacéutica. El vehículo farmacéutico o diluyente puede ser, por ejemplo, una disolución isotónica. Por ejemplo, formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio, y/o polietilenglicoles; aglutinantes; por ejemplo, almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, ácido alginico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; tintas; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Tales preparaciones farmacéuticas pueden fabricarse de manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulación, formación de comprimidos, recubrimiento con azúcar o de recubrimiento con película.

20 Dispersiones líquidas para administración por vía oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

25 Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o poli(alcohol vinílico). Las suspensiones o disoluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

Las disoluciones para intravenosa o infusiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o preferentemente pueden estar en forma de soluciones salinas isotónicas acuosas estériles.

30 Para supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente 1 % al 2 %.

35 Las formulaciones orales incluyen tales excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 % al 95 % de principio activo, preferentemente 25 % al 70 %. Si la composición farmacéutica se liofiliza, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se efectúa preferentemente en tampón.

40 Pueden proporcionarse cápsulas, comprimidos y píldoras para administración por vía oral a un paciente con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa o hidroxipropilmetilcelulosa.

45 También pueden usarse composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración por inyección sin aguja, por ejemplo, por vía transdérmica. Las composiciones según la invención pueden presentarse en todas las formas de dosificación normalmente usadas para administración tópica, en particular en forma de disoluciones acuosas, acuosas-alcohólicas o aceitosas, de dispersiones de la loción o tipo de suero, de geles anhidros o lipófilos, de emulsiones de consistencia líquida o semi-sólida del tipo leche, obtenidas dispersando una fase grasa en una fase acuosa (O/VV) o viceversa (VV/O), o de suspensiones o emulsiones de consistencia semi-sólida blanda del tipo de crema o gel, o alternativamente de microemulsiones, de microcápsulas, de micropartículas o de dispersiones vesiculares con el tipo iónico y/o no iónico. Estas composiciones se preparan según métodos convencionales.

55 También pueden usarse para el cuero cabelludo en forma de disoluciones acuosas, alcohólicas o acuosas-alcohólicas, o en forma de cremas, geles, emulsiones o espumas, o alternativamente en forma de composiciones en aerosol que también contienen un agente propulsor a presión.

Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones según la invención son aquellas tradicionalmente usadas en los campos en cuestión.

60 Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o polinucleótido. La dosis puede determinarse según diversos parámetros, especialmente según el polipéptido o polinucleótido usado; la edad, peso y afección del paciente que va a tratarse; la vía de administración; y la pauta requerida. Otra vez, un médico será capaz de determinar la vía de administración requerida y dosificación para cualquier paciente particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,001 a 50 mg por kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, según la actividad del polipéptido, la edad, peso y afecciones del sujeto que van a tratarse, el tipo y

gravedad de la enfermedad y la frecuencia y vía de administración. Preferentemente, los niveles de dosificación diaria son de 0,5 mg a 2 g. Pueden usarse dosificaciones más bajas para administración tópica.

Las secuencias de nucleótidos de OmCI modificadas descritas anteriormente y los vectores de expresión que contienen tales secuencias también pueden usarse como formulaciones farmacéuticas como se explica resumidamente anteriormente. Preferentemente, el ácido nucleico, tal como ARN o ADN, en particular ADN, se proporciona en forma de un vector de expresión, que puede expresarse en las células del individuo que va a tratarse. Las formulaciones pueden comprender secuencias de nucleótidos desnudas o estar en combinación con lípidos catiónicos, polímeros o sistemas que eligen diana. Las formulaciones pueden administrarse por cualquier técnica disponible. Por ejemplo, el ácido nucleico puede introducirse por inyección con aguja, preferentemente por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Alternativamente, el ácido nucleico puede administrarse directamente a través de la piel usando un dispositivo de administración de ácidos nucleicos tal como administración génica mediada por partícula. El ácido nucleico puede administrarse apicalmente a la piel, o a las superficies de la mucosa, por ejemplo, por administración intranasal, oral, intravaginal o intra-rectal.

La captación de las construcciones de ácidos nucleicos puede potenciarse por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectam y transfectam. La dosificación del ácido nucleico que va a administrarse puede alterarse. Normalmente, el ácido nucleico se administra en el intervalo de 1 pg a 1 mg, preferentemente a 1 pg a 1 µg de ácido nucleico para la administración génica mediada por partícula y 10 µg a 1 mg para otras vías.

Ejemplos

Ejemplo 1: OmCI no mutante se une a 12(S)-HETE (ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico) en un ELISA competitivo

Antecedentes:

Se une OmCI a ácidos grasos (Figura 1). La espectroscopía de masas muestra que el ácido ricinoleico ($C_{18}H_{34}O_3$) y el ácido palmítoleico ($C_{16}H_{30}O_2$) son las formas predominantes encontradas en OmCI expresado en *P. methanolica* y *E. coli*, respectivamente. Sin embargo, es más probable que los ligandos fisiológicos verdaderos sean uno o más de los muchos eicosanoides derivados de la membrana de células huésped que median en inflamación, estrés oxidativo y señalización celular.

Están disponibles inmunoensayos enzimáticos competitivos (EIA) de Assay Designs Inc. para la cuantificación de varios eicosanoides. Un kit de EIA tal usa un anticuerpo policlonal para 12(S)-HETE para unir 12(S)-HETE marcado con fosfatasa alcalina y competir con 12(S)-HETE no marcado en la muestra o patrones de concentración conocida. Después de la incubación simultánea a temperatura ambiente y la captura del anticuerpo sobre la placa, se lava el exceso de reactivos, se añade el sustrato y la reacción se mide por lector de microplacas. Cuanto mayor sea la concentración de 12(S)-HETE en la muestra o patrón, menor será la lectura de absorbancia, debido a que el ácido graso no marcado compite por la unión con la molécula de fosfatasa alcalina marcada.

Los presentes inventores supusieron que OmCI competiría por la unión con los anticuerpos específicos para eicosanoide usados en los inmunoensayos. Se eligió el ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (12(S)-HETE) para probar esta idea ya que es (quizás) el eicosanoide con las características fisicoquímicas más similares al ácido ricinoleico (que, a partir de los datos cristalográficos de los presentes inventores, se predice que se une más fuertemente que el ácido palmítoleico). Entre otros efectos, se ha mostrado que 12(S)-HETE es quimiotáctico y quimiocinético para los leucocitos polimorfonucleares y células de músculo liso vasculares.

Métodos:

El kit de EIA de 12(S)-HETE era de Assay Designs (Cat. No. 900-050). Las disoluciones madre de OmCI usadas se expresaron tanto en levadura (yOmCI) como bacteria (bOmCI). Ambas disoluciones madre fueron $\geq 98\%$ puras, 8,3 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 (PBS). La proteína de unión a histamina de garrapata de control negativo RaHBP2, que también es una lipocalina (Paesen *et al.*, 1999), se expresó en bacterias y también fue $\geq 98\%$ pura, 8,3 mg/ml en PBS. Se diluyó patrón de 12(S)-HETE a 50000, 12500, 3125, 781, 195 pg/ml en el tampón de ensayo suministrado con el kit. Se mezclaron 100 µl de las disoluciones de 12500, 3125 y 0 pg/ml con ≤ 9 µl de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 (PBS) o disoluciones de OmCI o RaHBP2 en PBS. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego se usaron en el inmunoensayo de 12(S)-HETE según las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia de las muestras tratadas se compararon con una curva patrón para estimar la concentración de 12(S)-HETE disponible en disolución para la unión por el anticuerpo policlonal anti-12(S)-HETE.

Resultados:

bOmCI, pero no RaHBP2, disminuye la cantidad de 12(S)-HETE disponible en disolución para la unión a anticuerpo, que sugiere que bOmCI se une directamente a 12(S)-HETE (Fig. 2). PBS y ambas de las preparaciones de proteínas purificadas bOmCI y RaHBP2 parecen contener algo (≤ 1000 pg/ml) de 12(S)-HETE. Se usaron métodos similares para mostrar que OmCI se une a LTB₄ (datos no mostrados).

Discusión:

Estos resultados iniciales con la proteína bacterianamente expresada sugieren que OmCI puede unirse a ácidos grasos que son más largos (C20) y tienen un mayor número de enlaces insaturados (cuatro) que cualquier ácido palmítico (C16 y 1 doble enlace) o ricinoleico (C18 y 1 doble enlace). Además, 12(S)-HETE no tiene un doble enlace en C9 - C10 que se predijo que era importante para la unión a ligando. Los resultados también sugieren que el ácido palmítico puede ser desplazado del bolsillo de unión de bOmCI por 12(S)-HETE. Aunque se necesita precaución con esta suposición, ya que OmCI se usó en gran exceso molar (~1000 - 4000 veces) y es posible que una proporción de bOmCI purificado no está ocupada por ningún ligando.

Ejemplo 2: La unión de LTB₄ por OmCI no mutante es evidente por absorbancia

Antecedentes:

Los leucotrienos tienen espectros de absorción de UV fuertes característicos debido a sus sistemas de dobles enlaces conjugados (el cromóforo de trieno). En medio acuoso, LTB₄ tiene un pico absorbancia a 271 nm y 'hombros' a 262 nm y 282,5 nm. La absorbancia pico de la proteína es a 280 nm. OmCI unido a LTB₄ debe presentar elevada absorbancia de UV a aproximadamente 280 nm, en comparación con la proteína por sí misma, y los hombros característicos de LTB₄ 10 nm a cualquier lado del pico absorbancia.

Método:

Se incubó bOmCI (4,5 mg) con 1,8 ml de LTB₄ (50 ng/μl de disolución madre en etanol puro, Biomol International) en 39 ml de PBS a temperatura ambiente con agitación durante 10 minutos. Esta mezcla está en una relación molar 1:1 entre OmCI y LTB₄. La mezcla se concentró a 200 μl en el dispositivo de ultrafiltración de 5 kDa de corte Vivaspín (Sartorius). El concentrado se lavó con otros 30 ml de PBS y se concentró a 200 μl. En paralelo, se incubó la misma cantidad (4,5 mg) de bOmCI con 1,8 ml de etanol ultrapuro en 39 ml de PBS, luego se concentró y se lavó como se ha descrito anteriormente. El volumen final de las proteínas concentradas fue 200 μl. Se examinaron los espectros de absorción de UV de las proteínas usando un espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop.

Resultados:

Los espectros obtenidos se muestran en la Fig. 3. LTB₄ solo tiene los picos de absorbancia característicos esperados en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 con picos a 271, 261 y 281 nm (Fig. 3A). Los espectros de absorción de bOmCI se incubaron con LTB₄, se lavaron ampliamente para eliminar LTB₄ residual, tienen hombros indicativos de unión de LTB₄ y la absorbancia pico es significativamente superior a bOmCI incubado con etanol puro (Fig. 3B). Esto indica que bOmCI se une selectivamente a LTB₄ y lo elimina de la disolución. De hecho, no es detectable LTB₄ en el flujo a través de la etapa de ultrafiltración inicial (Fig 3A) que indica que (dentro de los límites de detección) todo el LTB₄ añadido a la mezcla inicial fue unido por bOmCI.

Se observaron cambios significativos en los espectros de UV de LTB₄ unido por bOmCI. El máximo de UV presentó un desplazamiento batocrómico de + 6 nm (al rojo) a 277, 267 y 287 nm (Fig. 3A y B). El desplazamiento está lo más probablemente producido por las interacciones de dispersión entre el leucotrieno conjugado y los aminoácidos de bOmCI. Esto está de acuerdo con el cromóforo de trieno que está completamente englobado por la proteína. Interacciones similares producirán hipocromismo de la absorción de UV por el cromóforo de trieno. Esto no se midió directamente, pero es notable que la absorción pico esperada del LTB₄ de entrada concentrado a 200 μl (volumen final de proteína concentrada) sería 55,8 (cálculo $41,32 \text{ ml}/0,2 \text{ ml} \times 0,27 \text{ 10 mm de absorbancia}$) mientras que la absorción pico total de LTB₄ unido a bOmCI fue aproximadamente 35,07 (cálculo absorción a 10 mm pico de bOmCI:LTB₄ menos absorción pico de bOmCI, es decir, 61,19 - 26,12). Suponiendo pérdidas de proteína mínimas, el cálculo implica hipocromismo.

Ejemplo 3: Los datos estructurales cristalográficos muestran LTB₄ en el bolsillo de unión de bOmCI mutante.

Método:

Se preparó la proteína pOmCI cargada con LTB₄ como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2), luego se concentró a 25 mg/ml, el tampón se intercambió a Tris-HCl a pH 7, NaCl 30 mM y se usó para hacer crecer los cristales. Se recogió un conjunto de datos de difracción de un cristal monoclinico P2₁ de OmCI:LTB₄ (a=41,76 Å b=112,81 Å c=62,40 Å β=101,89°, 4 copias/unidad asimétrica) en julio de 2008 en BM14@ESRF. Los datos se han procesado a resolución de 2,0 Å, la estructura se determinó inicialmente por sustitución molecular y el modelo de OmCI:LTB₄ se construyó y refinó a R=20,7 R_{libre}=23,7, rmsd_{enlaces}=0,005, rmsd_{ángulos}=0,9.

Resultados:

La Figura 4 muestra una representación de esferas y palillos de LTB₄ en el bolsillo de unión de bOMCI. Los siguientes residuos están directamente implicados en la unión a LTB₄:

- Arg54, Thr85, Trp87: estos residuos unen con hidrógeno la cabeza (grupo carboxi) de LTB₄; modificaciones de estos residuos pueden manipularse para unir ligandos que se diferencian en la química del grupo de cabeza
- El cuerpo hidrófobo de LTB₄ pone en contacto las cadenas laterales hidrófobas del bolsillo: Phe36, Tyr43, Pro61, Leu70, Val72, Phe76, Leu57, Met74, Arg107, Phe89, Trp133, Trp87, Gly59
- Arg107 y Gln105 reconocen -OH en el carbono 5 (C5) de LTB₄
- His119 y Asp121 reconocen -OH en el carbono 12 (C12) de LTB₄

El ácido ricinoleico carece del grupo -OH en el carbono 5, solo tiene un único doble enlace entre C9 y C10 y es dos átomos de carbono más corto que LTB₄. Las principales diferencias estructurales entre OMCI unido al ácido ricinoleico unido en comparación con LTB₄ están en la región del bucle 132-142 que es necesaria para la inhibición de C5 (Mans y Ribeiro, 2008). Las diferencias pueden resumirse del siguiente modo:

- Giro de las cadenas laterales de Glu141 y His164 (estos cambios en His164 y Glu141 están relacionados mediante dos enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales de Arg47 y Arg148); como resultado de estos giros de las cadenas laterales, se pierde el puente salino de His164:Asp136 y el bucle 132-142 se retrae mediante un giro de la cadena lateral de His 117, que une hidrógeno a G139, y pérdida del agua de enlace. Este cambio conformacional inducido por la unión de LTB₄ puede tener un efecto de la unión cinética de OmCI a C5, pero los presentes inventores no tienen presentemente ninguna evidencia directa de esto.
- La segunda región que muestra una reorganización menor es 155-159. No existe contacto directo entre la región inhibidora de C5 132-142 y el bolsillo. La estructura de bucle de 132-142 es la misma en las cuatro copias en la unidad asimétrica a pesar de que este bucle está en tres entornos de empaquetamiento cristalino diferentes a través de las 4 copias: así es posible que las diferencias con relación a la estructura del ácido ricinoleico sean debidas a la sutil propagación de la estructura de ligando a bucle mediante una capa intermedia de pequeños cambios.

Ejemplo 4: Ácidos grasos presentes en OmCI recombinante expresado en bacterias**Antecedentes:**

Se sabe que el ácido ricinoleico (47 %), el éster metílico del ácido palmítico (21 %) y el éster metílico del ácido esteárico (11 %) son los ácidos grasos predominantes unidos por OmCI recombinante expresado en levadura. También se ha mostrado recientemente que OmCI puede unirse al ácido 12(S)-hidroxieicosatetraenoico (HETE) y lo más fuertemente a LTB₄. Se sabe que los homólogos de OmCI se unen a ácido araquidónico. Los presentes inventores han mostrado que OmCI expresado en bacterias todavía se une a otros ácidos grasos.

Método:

Se evaporó el extracto de proteína OMCI en bruto (CHCl₃, 130 µl) a sequedad a temperatura ambiente con una ligera corriente de nitrógeno. Se añadieron algunas gotas de una disolución etérea de diazometano para convertir el ácido libre en el éster metílico. Después de 10 min, el disolvente y el exceso de diazometano se eliminaron por una corriente de nitrógeno y la muestra se recogió en diclorometano (50 µl). Después de concentración adicional a 10 µl, la muestra se usó directamente para el análisis de CG-EM. El ácido graso de referencia se convirtió asimismo en el éster metílico por diazometano antes del análisis de CG-EM en un TraceEM (ThermoFinnigan, D-63329 Egelsbach, Alemania) equipado con capilar de sílice fusionada Alltech EC5 (D-82008 Unterhaching, Alemania) (15 m x 0,25 mm, 0,25 µm) usando He a 1,5 ml min⁻¹ como gas portador. Se inyectaron muestras (1 µl) en el modo sin fraccionamiento (1 min) y se separaron bajo condiciones programadas empezando a 60 °C (1 min), seguido de calentamiento con 10 °C min⁻¹ a 180 °C, y con 4 °C min⁻¹ a 280 °C mantenido durante 2 min. Se midieron espectros de barrido completo en modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV, con una temperatura de la fuente de 200 °C, línea de transferencia a 280 °C, y una corriente de emisión de 250 µA. El instrumento operó entre m/z 50 y m/z 540 a 2 barridos s⁻¹. La presencia de ésteres metílicos del ácido palmítico y eláidico se confirmó comparando con muestras auténticas.

Resultados:

Para la identificación del ácido graso asociado a proteína, la muestra esterificada se analizó por cromatografía de gases (Fig. 5) y espectroscopía de masas (no mostrado). El principal componente (64 %) parece ser el isómero *cis* del ácido palmitoleico (C16:1 *cis*). Hay un componente minoritario (7,6 %) de un ácido graso monoinsaturado C17:1 con tanto isómeros *cis* como *trans* presentes. Los compuestos finales son C18:1 prevaleciendo el isómero *trans*. El ácido oleico (C18:1 *cis*) es un compuesto minoritario (2,7 %). El principal componente C18:1 es probablemente

elaídico, sin embargo, el tiempo de retención no fue perfectamente idéntico a la referencia, mientras que sí fue el ácido oleico. Lo que los presentes inventores llamaron ácido elaídico puede realmente ser ácido vaccénico (C18:1 trans pero con el doble enlace en C11 en lugar de C9 en ácido elaídico u oleico). La aparición de *trans*-ácidos grasos es coherente del origen bacteriano de OMCI. Los ácidos saturados no son de la muestra, sino que ya estaban presentes en el reactivo de siliación (C16:0 y C18:0) y no se incluyeron en la cuantificación.

Discusión:

Puede unirse OmCI a una variedad de ácidos grasos entre 16 y 20 carbonos de longitud que varían en número y posición de sus enlaces insaturados y grupos hidroxilo. Está presente una variedad de ácidos grasos en OmCI recombinantemente expresado. La identidad de los ácidos grasos presente en la cavidad de unión depende de su concentración en la disolución de proteína y la especificidad de unión por cada ácido graso.

Ejemplo 5: La mutagénesis dirigida al sitio de residuos específicos dentro del bolsillo de unión de OmCI destruye la unión de LTB₄.

Antecedentes

LTB₄ está encerrado por OmCI dentro de un bolsillo de unión. El bolsillo puede bloquearse, y prevenirse la unión de LTB₄, usando mutagénesis dirigida al sitio para insertar un gran residuo, tal como triptófano, en lugar de uno más pequeño presente en la proteína natural. La unión de LTB₄ a OmCI puede medirse mediante una variedad de técnicas que incluyen inmunoensayos enzimáticos competitivos (EIA) disponibles para la cuantificación de eicosanoides. En el ensayo, OmCI compite por la unión con los anticuerpos específicos para LTB₄ usados en el EIA.

Método:

Se usó mutagénesis dirigida al sitio por PCR para cambiar la fenilalanina 36 por el triptófano (yOmCI-F36W) y, por separado, la glicina 59 por triptófano (yOmCI-G59W). Las proteínas mutantes se expresaron en levadura (*Pichia methanolica*), se purificaron a homogeneidad (>95 % pura) y las concentraciones se determinaron por absorción. La unión de los mutantes a LTB₄ se comparó con el mutante usando kits de EIA de Assay Design Inc (véase el Ejemplo 1).

Resultados:

Como se muestra en la Fig. 6, yOmCI-F36W y yOmCI-G59W mostraron significativamente menos unión a LTB₄ que yOmCI no mutante. El modelado indica que las mutaciones bloquean el bolsillo de unión. Es probable que estos mutantes prevengan la unión de todos los ácidos grasos y no solo LTB₄.

Discusión:

La capacidad de OmCI para unirse a moléculas de LK/E tales como LTB₄ puede reducirse o eliminarse mutando residuos claves dentro del bolsillo de unión de OmCI. Este sitio de unión es distinto al sitio de unión del complemento de OmCI. Por tanto, eliminando específicamente la actividad de unión de LK/E, los polipéptidos de OmCI modificados pueden usarse para dirigir enfermedades mediadas por el complemento y condiciones sin interferir con la acción de LK/E.

Ejemplo 6: Mutantes dirigidos al sitio de OmCI, que son incapaces de unirse a LTB₄, pueden inhibir el complemento

Antecedentes

Podría prevenirse la mutación de los residuos que previenen la unión de LTB₄ yOmCI-F36W y yOmCI-G59W que actúan como inhibidores del complemento. Los presentes inventores, por tanto, compararon la inhibición de la vía clásica del complemento por OmCI no mutante y los mutantes yOmCI-F36W y yOmCI-G59W.

Método:

Glóbulos sanguíneos de oveja fueron de los Servicios de cultivo de tejido. Se obtuvo hemolisina de Sigma. Los sueros de cobaya fueron de animales en casa. Se lavaron cinco ml de sangre de oveja fresca en disolución de Alsever (1:1 vol/vol) una vez en 50 ml de gelatina veronal barbitol-EDTA (GVB-EDTA) y tres veces en 50 ml de tampón GVB²⁺ (tampón GVB con Mg²⁺ y Ca²⁺). La sangre se diluyó a una concentración de 1×10^9 células ml⁻¹. Los eritrocitos se sensibilizaron usando hemolisina de conejo, se valoraron como se describió (Coligan, 1994). Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen total de 100 μ l usando 100 μ l de 1:320 de suero de cobaya diluido en GVB²⁺ como fuente de complemento y 50 μ l de 2×10^8 eritrocitos sensibilizados (EA) según protocolos convencionales (Giclas, 1994). Se añadieron cinco microgramos de las proteínas recombinantes OmCI o PBS (5 μ l) finalmente, y las reacciones se incubaron con agitación (500 rpm) a 37 °C. Después de 30 min, las células completas

se centrifugaron a 12000 x g durante 5 segundos y la hemólisis se midió espectrofotométricamente a 412 nm (Coligan, 1994). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Resultados:

5 Como se muestra en la Fig. 7, yOmCI-F36W y yOmCI-G59W inhibieron la vía clásica de activación del complemento tan potentemente como OmCI no mutante a la concentración (5 microgramos por reacción) usada.

10 En otro experimento, se sensibilizaron glóbulos rojos de oveja usando hemolisina de conejo (Sigma), se lavaron en tampón GVB²⁺ (tampón GVB con Mg²⁺ y Ca²⁺) y se ajustaron a 1×10^9 células ml⁻¹. Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen total de 100 μ l usando 50 μ l de 1:320 de suero de cobaya diluido en GVB²⁺ como fuente de complemento y 50 μ l de 2×10^8 células de eritrocito activado (EA) ml⁻¹. Se añadieron cinco microlitros de OMCI no mutante o mutante recombinante o proteína de control RaHBP2 diluida en PBS finalmente, y las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las células completas se centrifugaron entonces a 12000 x g durante 5 segundos y la hemólisis se midió espectrofotométricamente a 412 nm. El porcentaje de lisis de las muestras se calculó usando el valor de absorbancia para el 100 % de la lisis celular causada añadiendo agua en lugar de tampón GVB²⁺ a los EA.

Resultados:

20 La Fig. 8 muestra que no hay diferencia en la inhibición de la vía clásica de activación del complemento por OMCI no mutante y OMCI que es incapaz de unirse a LTB₄. Esto sugiere que la unión de LTB₄ no tiene efecto sobre la unión de OMCI a C5.

Discusión:

25 La capacidad de las dos formas mutantes de OmCI (yOmCI-F36W y yOmCI-G59W) para inhibir el complemento implica que la unión del ácido graso no es necesaria para OmCI para inhibir el complemento. Esto está soportado por los datos estructurales cristalográficos que muestran solo cambios mínimos en la estructura externa de OmCI, que media en la interacción con C5, cuando se une a LTB₄ o un ligando no fisiológico tal como ácido palmítico (véase el Ejemplo 3).

Ejemplo 7: OMCI solo y OMCI unido a C5 humana presentan la misma cinética de unión para LTB₄

Antecedentes

35 La unión de LTB₄ puede alterarse cuando OMCI se une a C5. Esto podría producirse mediante impedimento estérico, o mediante cambios en la entalpía y/o conformación. La posibilidad se evaluó comparando la unión cinética de LTB₄ radiomarcado a OMCI y OMCI en complejo con C5 humana (hC5).

Método:

40 Se incubaron OMCI bacteriano purificado recombinante y hC5 (Calbiochem) a una relación molar 1:2 en PBS a TA durante 10 minutos para formar el complejo de OMCI:hC5. La formación del complejo se confirmó por desplazamiento en gel de poliacrilamida nativo (datos no mostrados). Se diluyeron sucesivamente cantidades iguales de OMCI:hC5 o OMCI solo en 75 μ l de PBS antes de añadir 75 μ l de PBS que contenía ~ 24000 c.p.m de [5,6,8,9,11,12,14,15-³H(n)]-LTB₄ (Perkin Elmer, NEN Biotech, Lote 3589956; actividad total 5 μ Ci o 185 kBq; actividad específica 190 Ci/mmol). Tras la incubación (3 h, TA), las muestras se centrifugaron a 8000 g durante 2 minutos y la radiactividad restante en disolución se midió en un contador de centelleo líquido Wallac 1217 Rackbeta después de transferir 20 μ l del sobrenadante a 4 ml de mezcla de centelleo de valor Beckman Ready. Se usaron PBS solo y diluciones sucesivas de RaHBP2 y hC5 en PBS como controles negativos.

Resultados:

55 La Fig. 9a muestra que OMCI y OMCI:hC5 muestran unión saturable a ³H-LTB₄, mientras que PBS (no mostrado), RaHBP2 y hC5 no. El ensayo usado aquí en realidad mide la capacidad de OMCI para unirse a LTB₄ y mantenerlo en disolución. No más del 20 % del LTB₄ marcado siguió en disolución en las muestras de control negativo, mientras que más del 50 % siguió en disolución a las mayores concentraciones de OMCI (Fig. 9a). Las constantes de asociación y de disociación no pueden derivarse con exactitud usando estos datos, sin embargo, la comparación de la pendiente de las funciones de regresión logarítmica para concentraciones equivalentes de OMCI y OMCI:hC5 indican que la unión cinética entre LTB₄ y OMCI no se altera por unión a C5 (Fig. 9b). Estos datos están de acuerdo con el uso de caras opuestas de OMCI para la unión a C5 y la entrada de LTB₄ a la cavidad de unión de lipocalina.

Referencias

65

- Aya, I. (2006) Blockade of leukotriene B4 signalling pathway directly inhibits cell proliferation and induces apoptosis colon cancer, *Yokohama Medical Journal* 57, 43-52.
- 5 Coligan, J. E. (1994). Complement. In "Current Protocols in Immunology". (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marguiles, E. M. Shevach, and W. Strober, Eds.). Wiley Interscience.
- Del Prete A., Shao W.H., Mitola S., Santoro G., Sozzani S., and Haribabu, B. (2007) Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood*, 109, 626-631.
- 10 Ford-Hutchinson, A. (1990). Leukotriene B4 in inflammation. *Crit. Rev. Immunol.* 10, 1-12.
- Galbraith W.M., Hobson W.C., Giclas P.C., Schechter P.J. and Agrawal S. (1994) Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense Res. Dev.* 4(3):201-6.
- 15 Giclas, P.C. (1994). Classical and alternative pathway evaluation (sections 13.1 and 13.2). In *Current Protocols in Immunology*, Vol. 3, Complement. Editors: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M. Shevach and W. Strober. Series editor: R. Coico. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- 20 Hao C.M. and Breyer M.D. (2007). Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney International* 71, 1105-1115.
- 25 Harrison, K. A., Murphy, R.C. (1995). Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 270, 17273-17276.
- 30 Hepburn, N.J., Williams, A.S., Nunn, M.A., Chamberlain-Banoub, J.C., Hamer, J., Morgan, B.P. and Harris, C.L. (2007) In vivo characterisation and therapeutic efficacy of CS-specific inhibitor from the soft tick *Omithodoros moubata*. *J Biol Chem.* 282, 8292-8299.
- 35 Hoover, H., Karnovasky, M., Austen, K., Corey, E. and Lewis, R. (1984). Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 2191-2193.
- 40 Imig, J.D. (2000). Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F965-F981. Klaas P.J.M. van Gisbergen, Marta Sanchez-Hennandez, Teunis B.H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281-1292.
- 45 Kim, N.D., Chou, R.C., Seung, E., Tager, A.M. and Luster, A.D. (2006). A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203, 829-835.
- Miyahara, N., Miyahara, S., Takeda, K., and Gelfand G.W. (2006). Role of the LTB4/BLT1 Pathway in Allergen-induced Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. *Allergol Int.* 55, 91-7.
- 50 Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., & Nuttall, P.A. (2005) Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata* *J. Immunol.* 174, 2084-2091.
- Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 569-575.
- 55 Schwartz, G.K., Weitzman, A., O'Reilly, E., Brail, L., de Alwis, D.P., Cleverly, A., Barile-Thiem, B., Vinciguerra, V., and Budman D.R. (2005) Phase I and Pharmacokinetic Study of LY293111, an Orally Bioavailable LTB4 Receptor Antagonist, in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 5365-5373.
- Showell, H.J., Pettipher, E.R., Cheng, J.B., Breslow, R., Conklyn, M., Farrell, C.A, Hingorani, G.P., Salter, E.D., Hackman, B.C., Wimberly, D.J. et al (1995). The in vitro and in vivo pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696. *J. Pharm. Exp. Ther.* 273, 176-184.
- 60 Taube C., Miyahara N., Ott V., Swanson B., Takeda K., Loader J., Shultz L.D., Tager A.M., Luster A.D., Dakhama A., and Gelfand E.W. (2006) The leukotriene B4 receptor BLT1 is required for effector CD8+ T cell-mediated, mast cell-dependent airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 176, 3157-3164.
- 65 Yamaoka, K A., Claesson, H.E., and Rosen, A. (1989) Leukotriene B4 enhances activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 143, 1996-2000.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Natural Environment Research Council
<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES Y AFECCIONES MEDIADAS POR EL COMPLEMENTO
<130> N.107303A

10 <150> PCT/GB2009/000311
<151> 2009-02-05

<150> GB 0906779.4
<151> 2009-04-20

15 <160> 11

<170> PatentIn version 3.4

20 <210> 1
<211> 525
<212> ADN
<213> Ornithodoros moubata

25 <220>
<221> CDS
<222> (13)..(519)

30 <220>
<221> sig_peptido
<222> (13)..(66)

<400> 1

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 589 630 T3

```

5      taagagctca aa atg ctg gtt ttg gtg acc ctg att ttc tcc ttt tct gcg      51
          Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala
          1              5              10

10     aac atc gca tat gct gac agc gaa agc gac tgc act gga agc gaa cct      99
          Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro
          15              20              25

15     gtt gac gcc ttc caa gct ttc agt gag ggc aaa gag gca tat gtc ctg      147
          Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu
          30              35              40              45

20     gtg agg tcc acg gat ccc aaa gcg agg gac tgc ttg aaa gga gaa cca      195
          Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro
          50              55              60

25     gcc gga gaa aag cag gac aac acg ttg ccg gtg atg atg acg ttt aag      243
          Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys
          65              70              75

30     aat ggc aca gac tgg gct tca acc gat tgg acg ttt act ttg gac ggc      291
          Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly
          80              85              90

35     gca aag gta acg gca acc ctt ggt aac cta acc caa aat agg gaa gtg      339
          Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val
          95              100              105

38     gtc tac gac tcg caa agt cat cac tgc cac gtt gac aag gtc gag aag      387

35     Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys
          110              115              120              125

40     gaa gtt cca gat tat gag atg tgg atg ctc gat gcg gga ggg ctt gaa      435
          Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu
          130              135              140

45     gtg gaa gtc gag tgc tgc cgt caa aag ctt gaa gag ttg gcg tct ggc      483
          Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly
          145              150              155

50     agg aac caa atg tat ccc cat ctc aag gac tgc tag gcggcc      525
          Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
          160              165

```

<210> 2

<211> 168

55 <212> PRT

<213> Ornithodoros moubata

<220>

<223> Secuencia de la proteína incluyendo péptido señal en los residuos 1 to 18

60

<400> 2

65

ES 2 589 630 T3

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

45 <210> 3
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Ornithodoros moubata
 50 <220>
 <223> Secuencia de la proteína que carece de péptido señal N terminal de
 <400> 3

55

60

65

ES 2 589 630 T3

5 Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15

10 Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30

15 Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln
 35 40 45

20 Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60

25 Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80

30 Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95

35 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
 100 105 110

40 Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys
 115 120 125

45 Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
 130 135 140

50 Pro His Leu Lys Asp Cys
 145 150

45 <210> 4
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(519)
 <220>
 <221> sig_peptide

55 <222> (13)..(66)
 <220>
 <223> Secuencia de SEQ ID NO:1 alterada por mutagénesis dirigida al sitio para prevenir la hiperglicosilación de péptido codificado. Los codones en las posiciones 244-246 y 316-318 son reemplazados con caa.

60 <400> 4

65

ES 2 589 630 T3

5 taagagctca aa atg ctg gtt ttg gtg acc ctg att ttc tcc ttt tct gcg 51
Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala
1 5 10

10 aac atc gca tat gct gac agc gaa agc gac tgc act gga agc gaa cct 99
Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro
15 20 25

15 gtt gac gcc ttc caa gct ttc agt gag ggc aaa gag gca tat gtc ctg 147
Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu
30 35 40 45

20 gtg agg tcc acg gat ccc aaa gcg agg gac tgc ttg aaa gga gaa cca 195
Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro
50 55 60

25 gcc gga gaa aag cag gac aac acg ttg ccg gtg atg atg acg ttt aag 243
Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys
65 70 75

30 caa ggc aca gac tgg gct tca acc gat tgg acg ttt act ttg gac ggc 291
Gln Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly
80 85 90

35 gca aag gta acg gca acc ctt ggt caa cta acc caa aat agg gaa gtg 339
Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Gln Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val
95 100 105

40 gtc tac gac tcg caa agt cat cac tgc cac gtt gac aag gtc gag aag 387
Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys
110 115 120 125

45 gaa gtt cca gat tat gag atg tgg atg ctc gat gcg gga ggg ctt gaa 435
Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu
130 135 140

50 gtg gaa gtc gag tgc tgc cgt caa aag ctt gaa gag ttg gcg tct ggc 483
Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly
145 150 155

55 agg aac caa atg tat ccc cat ctc aag gac tgc tag gcggcc 525
Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
160 165

55 <210> 5
<211> 168
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
60 <223> Péptido secuencia codificada por SEQ ID NO: 4. Mutagénesis dirigida al sitio de la SEQ ID NO: 4 resultados
en Gln en lugar de Asn en las posiciones 78 y 102 en comparación con la SEQ ID NO: 2 para evitar
hiperglicosilación
<400> 5

65

ES 2 589 630 T3

1 Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
 5 Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala
 Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser
 Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro Ala Gly Glu
 10 Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Gln Gly Thr
 Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 Thr Ala Thr Leu Gly Gln Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 15 Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val
 20 Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln
 Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
 25 165

<210> 6
 <211> 525
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(519)

35 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (13)..(66)

40 <220>
 <223> Ornithodoros moubata mutante OMCI-F36W: secuencia de la SEQ ID NO: 1 alterado por mutagénesis dirigida al sitio para cambiar la fenilalanina (F) 36 de triptófano (W) para evitar los codones de unión de ácidos grasos en las posiciones 118-120 están sustituido con TGG.
 <400> 6

45 taagagctca aa atg ctg gtt ttg gtg acc ctg att ttc tcc ttt tct gcg 51

50

55

60

65

ES 2 589 630 T3

```

Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala
1           5           10
5  aac atc gca tat gct gac agc gaa agc gac tgc act gga agc gaa cct 99
   Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro
     15           20           25
10 gtt gac gcc ttc caa gct tgg agt gag ggc aaa gag gca tat gtc ctg 147
   Val Asp Ala Phe Gln Ala Trp Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu
     30           35           40           45
15 gtg agg tcc acg gat ccc aaa gcg agg gac tgc ttg aaa gga gaa cca 195
   Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Gly Glu Pro
           50           55           60
20 gcc gga gaa aag cag gac aac acg ttg ccg gtg atg atg acg ttt aag 243
   Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys
           65           70           75
25 aat ggc aca gac tgg gct tca acc gat tgg acg ttt act ttg gac ggc 291
   Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly
           80           85           90
30 gca aag gta acg gca acc ctt ggt aac cta acc caa aat agg gaa gtg 339
   Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val
           95           100           105
35 gtc tac gac tcg caa agt cat cac tgc cac gtt gac aag gtc gag aag 387
   Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys
     110           115           120           125
40 gaa gtt cca gat tat gag atg tgg atg ctc gat gcg gga ggg ctt gaa 435
   Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu
           130           135           140
45 gtg gaa gtc gag tgc tgc cgt caa aag ctt gaa gag ttg gcg tct ggc 483
   Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly
           145           150           155
50 agg aac caa atg tat ccc cat ctc aag gac tgc tag gcggcc 525
   Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
           160           165

```

```

50
<210> 7
<211> 168
<212> PRT
55 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Ornithodoros moubata mutant OmCI-F36W secuencia de protein incluyendo señasl de residues de péptido de
1 a 18
<400> 7
60 Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala Asn Ile Ala
   1           5           10           15
65 Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala

```


ES 2 589 630 T3

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

35 <210> 9
 <211> 525
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(519)
 <220>
 <221> sig_peptido
 45 <222> (13)..(66)
 <220>
 <223> Ornithodoros moubata mutación OmCI-G59W: secuencia de SEQ ID NO:1 alterado por mutagénesis dirigida
 al sitiopara cambiar la glicina (F) 59 de triptófano (W) para evitar que el ácido graso Los codones de unión en las
 posiciones 187-189 se sustituyen con TGG.
 50 <400> 9

55 taagagctca aa atg ctg gtt ttg gtg acc ctg att ttc tcc ttt tct gcg 51
 Met Leu Val Leu Val Thr Leu Ile Phe Ser Phe Ser Ala
 1 5 10
 60 aac atc gca tat gct gac agc gaa agc gac tgc act gga agc gaa cct 99
 Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro
 15 20 25

65

ES 2 589 630 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40

```

gtt gac gcc ttc caa gct ttc agt gag ggc aaa gag gca tat gtc ctg 147
Val Asp Ala Phe Gln Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu
30 35 40 45

gtg agg tcc acg gat ccc aaa gcg agg gac tgc ttg aaa tgg gaa cca 195
Val Arg Ser Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Trp Glu Pro
50 55 60

gcc gga gaa aag cag gac aac acg ttg ccg gtg atg atg acg ttt aag 243
Ala Gly Glu Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys
65 70 75

aat ggc aca gac tgg gct tca acc gat tgg acg ttt act ttg gac ggc 291
Asn Gly Thr Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly
80 85 90

gca aag gta acg gca acc ctt ggt aac cta acc caa aat agg gaa gtg 339
Ala Lys Val Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val
95 100 105

gtc tac gac tcg caa agt cat cac tgc cac gtt gac aag gtc gag aag 387
Val Tyr Asp Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys
110 115 120 125

gaa gtt cca gat tat gag atg tgg atg ctc gat gcg gga ggg ctt gaa 435
Glu Val Pro Asp Tyr Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu
130 135 140

gtg gaa gtc gag tgc tgc cgt caa aag ctt gaa gag ttg gcg tct ggc 483
Val Glu Val Glu Cys Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly
145 150 155

agg aac caa atg tat ccc cat ctc aag gac tgc tag gcggcc 525
Arg Asn Gln Met Tyr Pro His Leu Lys Asp Cys
160 165
  
```

45
 50

```

<210> 10
<211> 168
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Ornithodoros moubata OMCI mutación OmCI-G59W Secuencia de protein incluyendo señal de residuo de
péptido 1 a 18
  
```

55
 60
 65

```

<400> 10

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
  
```

ES 2 589 630 T3

Thr Asp Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Trp Glu Pro Ala Gly Glu
 50 55 60
 5
 Lys Gln Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr
 65 70 75 80
 10
 Asp Trp Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val
 85 90 95
 15
 Thr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp
 100 105 110
 20
 Ser Gln Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro
 115 120 125
 25
 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
 40
 <210> 11
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ornithodoros moubata OMCI mutación OmCI-G59W Falta de secuencia de proteína N de señal terminal de
 péptido.
 <400> 11
 45
 Asp Ser Glu Ser Asp Cys Thr Gly Ser Glu Pro Val Asp Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 50
 Ala Phe Ser Glu Gly Lys Glu Ala Tyr Val Leu Val Arg Ser Thr Asp
 20 25 30
 55
 Pro Lys Ala Arg Asp Cys Leu Lys Trp Glu Pro Ala Gly Glu Lys Gln
 35 40 45
 60
 Asp Asn Thr Leu Pro Val Met Met Thr Phe Lys Asn Gly Thr Asp Trp
 50 55 60
 65
 Ala Ser Thr Asp Trp Thr Phe Thr Leu Asp Gly Ala Lys Val Thr Ala
 65 70 75 80

ES 2 589 630 T3

Thr Leu Gly Asn Leu Thr Gln Asn Arg Glu Val Val Tyr Asp Ser Gln
85 90 95

5 Ser His His Cys His Val Asp Lys Val Glu Lys Glu Val Pro Asp Tyr
100 105 110

10 Glu Met Trp Met Leu Asp Ala Gly Gly Leu Glu Val Glu Val Glu Cys
115 120 125

15 Cys Arg Gln Lys Leu Glu Glu Leu Ala Ser Gly Arg Asn Gln Met Tyr
130 135 140

20 Pro His Leu Lys Asp Cys
145 150

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de OmCI que tiene actividad de unión de LTB₄ reducida o carece de ella, en el que dicho polipéptido de OmCI comprende:
- (a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que se ha modificado para eliminar o reducir la actividad de unión de LTB₄;
 - (b) una secuencia de aminoácidos de variante que tienen al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y que se ha modificado para eliminar o reducir la actividad de unión de LTB₄;
 - 10 (c) una secuencia de aminoácidos de variante de SEQ ID NO: 2 que tiene al menos el 60 % de identidad con la secuencia de aminoácidos entre los restos de aminoácidos 19 a 168 de SEQ ID NO: 2 y que se ha modificado para eliminar o reducir la actividad de unión de LTB₄; o
 - (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a), (b) o (c) que carece de actividad de unión de LTB₄.
- 15 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que se han mutado uno o más de los restos de aminoácidos dentro de la cavidad de unión de dicho polipéptido de OmCI.
3. El polipéptido de la reivindicación 2, en el que uno o más de los restos de aminoácidos que van a mutarse están seleccionados de Phe36, Arg54, Leu57, Gly59, Val72, Met74, Phe76, Trp87, Phe89, Gln105, Arg107, His119, Asp121 y Trp133, en el que la numeración de aminoácidos es con referencia a SEQ ID NO: 2.
- 20 4. El polipéptido de la reivindicación 2 o 3, en el que al menos una mutación de aminoácido está seleccionada de Phe36Trp y Gly59Trp.
- 25 5. Un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que carece de actividad de unión de LTB₄.
6. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de OmCI de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 30 7. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que comprende un polinucleótido según la reivindicación 6 o un vector según la reivindicación 7.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende:
- (a) un polipéptido de OmCI según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
 - (b) un polinucleótido según la reivindicación 6; o
 - (c) un vector según la reivindicación 7;
 - 40 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

50

55

60

65

Fig. 1

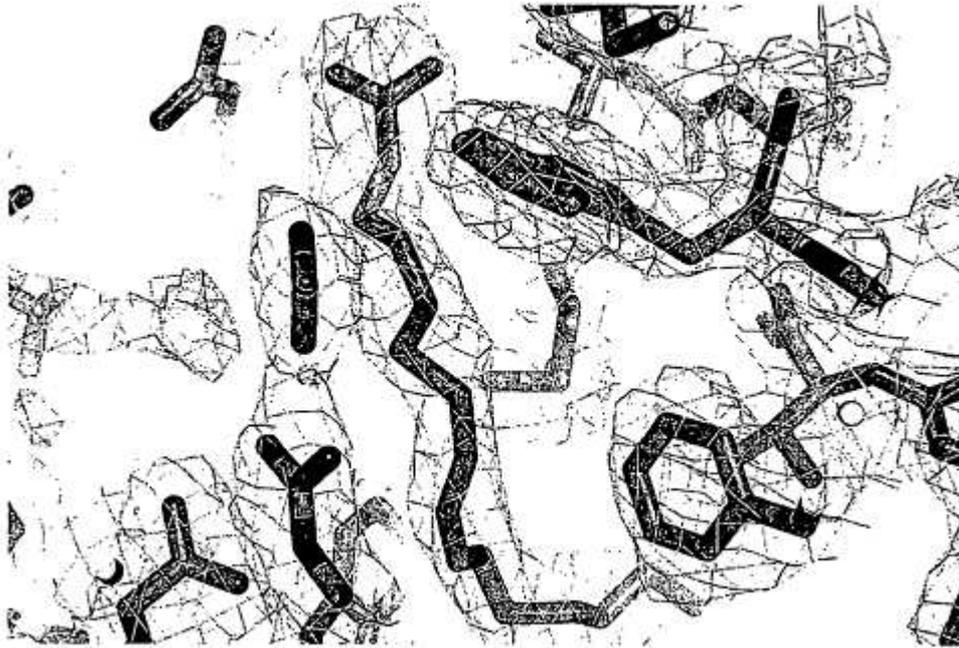


Fig. 2

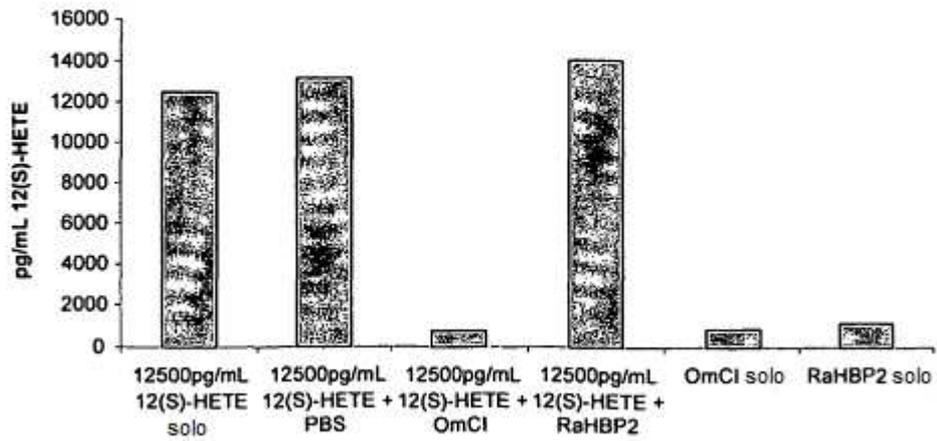


Fig. 3A

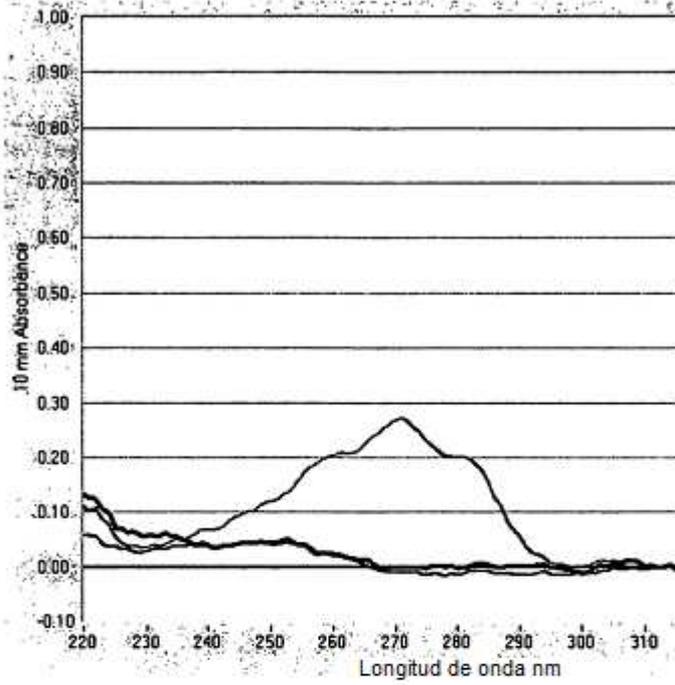


Fig. 3B

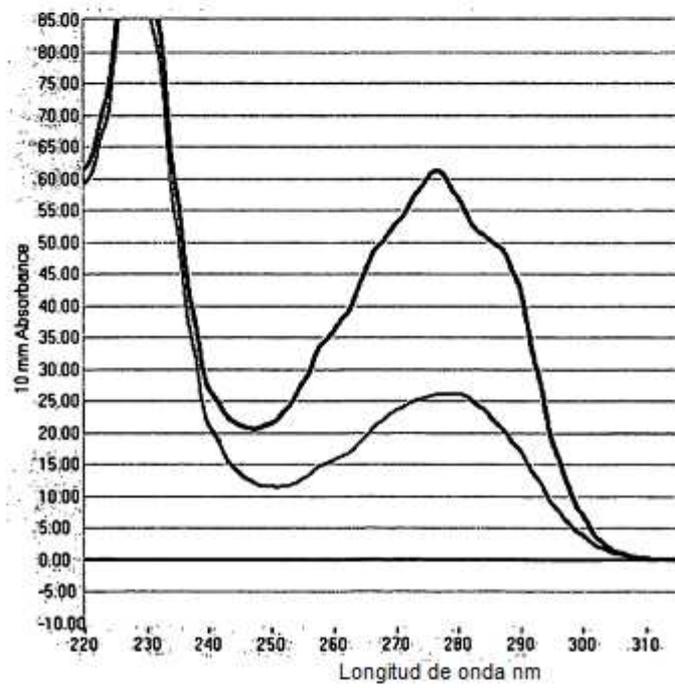
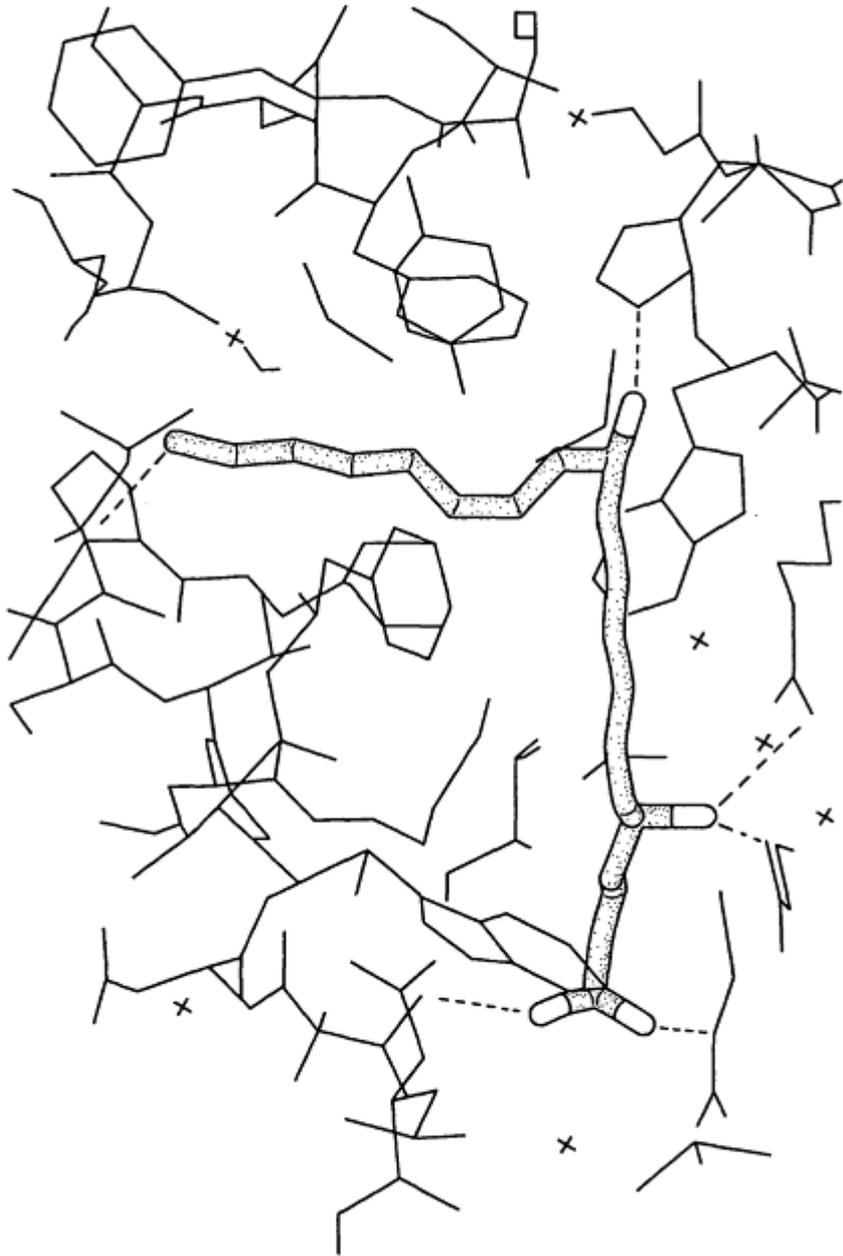


Fig. 4



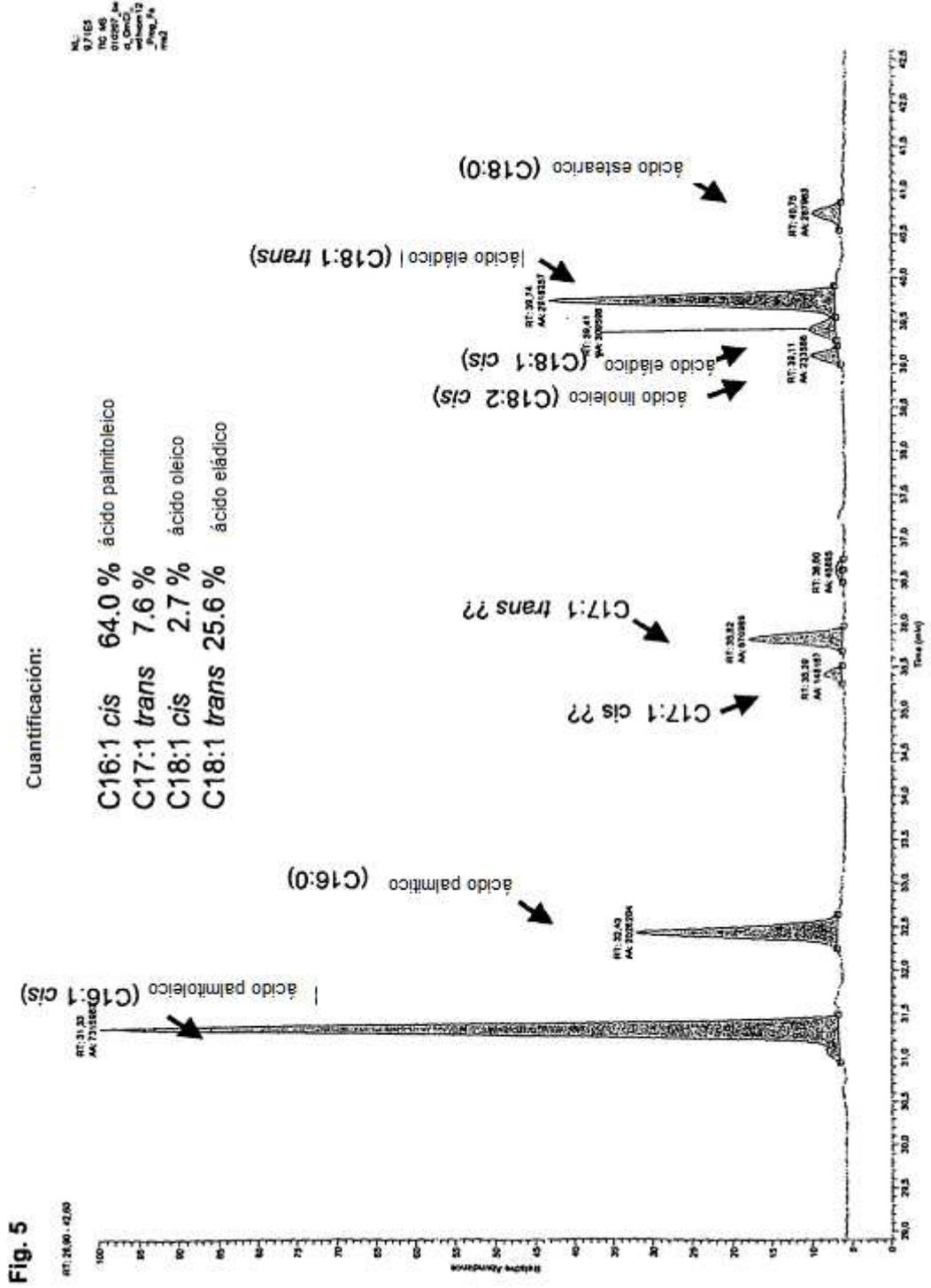


Fig. 6

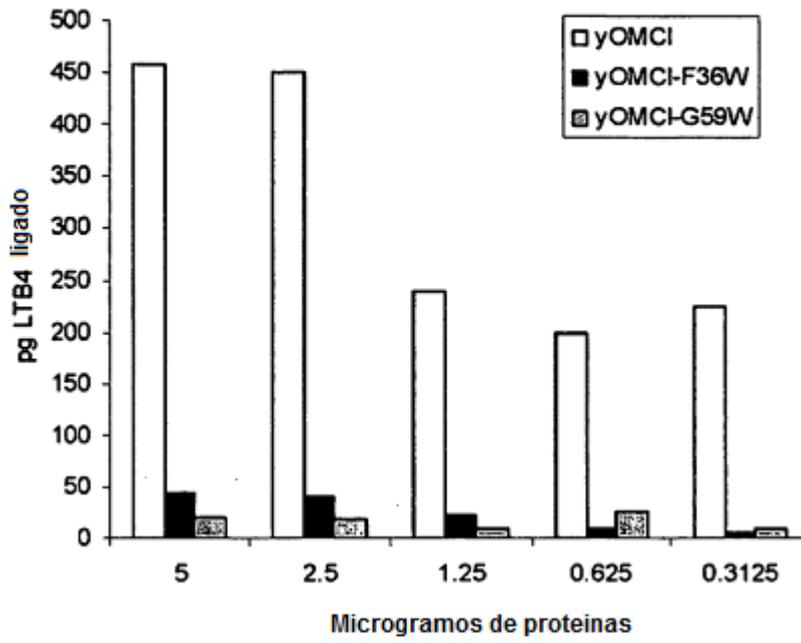


Fig. 7

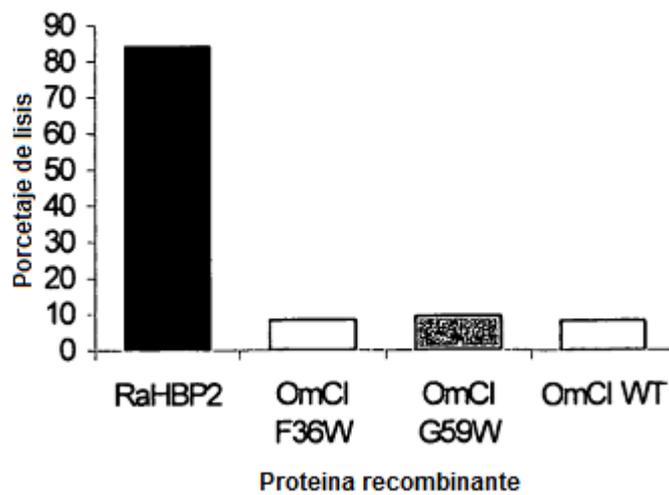


Fig. 8

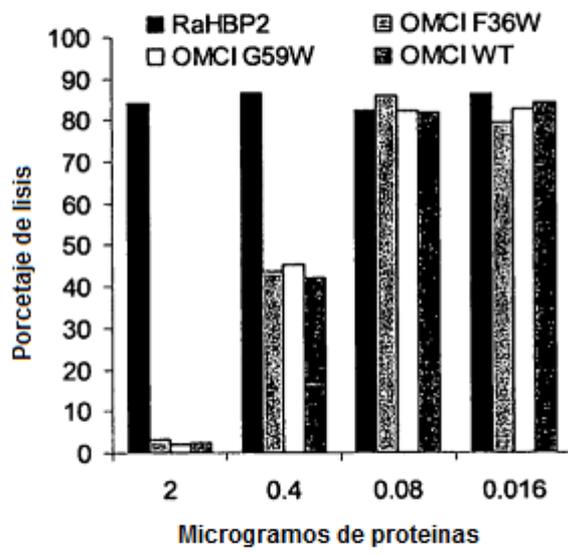


Fig. 9

