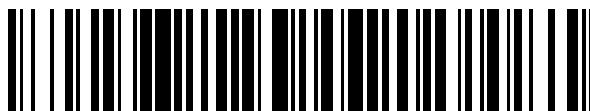


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 192**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06807665 .2**
96 Fecha de presentación: **30.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1943272**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

54 Título: **Nuevos antagonistas de quimioquinas CXC**

30 Prioridad:
31.10.2005 EP 05110205
04.11.2005 US 733547 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73 Titular/es:
MERCK SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH

72 Inventor/es:
PROUDFOOT, Amanda y
POWER, Christine

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 379 192 T3

DESCRIPCIÓN

Nuevos antagonistas de quimioquinas CXC

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a nuevos antagonistas de quimioquinas CXC, particularmente antagonistas de CXCL8 y quimioquinas CXC relacionadas, y a sus usos, particularmente como compuestos anti-inflamatorios o inmunomoduladores y en el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con las quimioquinas CXC.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Las quimioquinas son proteínas pequeñas, secretadas, pro-inflamatorias, que median la migración direccional de los leucocitos desde la sangre hasta el sitio de la lesión. Dependiendo de la posición de las cisteínas conservadas que caracterizan a esta familia de proteínas, la familia de las quimioquinas puede dividirse estructuralmente en quimioquinas C, CC, CXC y CX₃C que se unen a una serie de receptores de membrana (Baggiolini M et al., 1997). Estos receptores de membrana, todos receptores heptahelicoidales acoplados a proteína G, permiten a las quimioquinas ejercer su actividad biológica en las células diana, que pueden presentar combinaciones específicas de receptores según su estado y/o tipo. Los efectos fisiológicos de las quimioquinas resultan de un sistema complejo e integrado de interacciones concurrentes: los receptores tienen frecuentemente especificidad superpuesta de ligando, de manera que un único receptor puede unirse a diferentes quimioquinas. Una única quimioquina también puede unirse a diferentes receptores.

20 Los estudios sobre las relaciones estructura-actividad indican que las quimioquinas tienen dos sitios principales de interacción con sus receptores, la región amino terminal flexible y el bucle conformacionalmente rígido que está después de la segunda Cisteína. Se piensa que las quimioquinas se acoplan a los receptores mediante la región de bucle y se cree que este contacto facilita la unión de la región amino terminal que resulta en la activación del receptor.

25 Habitualmente, las quimioquinas se producen en el sitio de la lesión y causan la migración y activación de los leucocitos, jugando un papel fundamental en los procesos inflamatorios, inmunes, homeostáticos, hematopoyéticos y angiogénicos. Así, estas moléculas se consideran buenos candidatos diana para la intervención terapéutica en enfermedades asociadas con dichos procesos. La inhibición de las quimioquinas, o de sus receptores, puede reducir la maduración, reclutamiento y activación de los leucocitos, así como otros procesos patológicos relacionados con la angiogénesis o la arteriosclerosis (Baggiolini M, 2001).

30 Además de quimioquinas, anticuerpos y péptidos mutantes inhibidores y de pequeñas moléculas inhibitoras que bloquean los receptores, la búsqueda de antagonistas eficaces de las quimioquinas se ha extendido también a una serie de virus y otros organismos que, cuando entran en contacto con huéspedes humanos o mamíferos, muestran actividades inmunomoduladoras potentes que afectan al huésped.

35 El mimetismo viral de las citoquinas, quimioquinas y sus receptores puede indicar estrategias de inmunomodulación para desarrollar productos terapéuticos. Recientemente, se han revisado los factores inmunomoduladores expresados por los artrópodos hematófagos (tales como mosquitos, flebótomos y garrapatas) (Gillespie, RD et al, 2001).

40 En particular, las glándulas salivares de las garrapatas producen una mezcla compleja de moléculas bioactivas que tienen, en particular, actividades anti-inflamatorias, anti-hemostáticas y anti-inmunes. Éstas incluyen proteínas bioactivas que controlan la histamina, se unen a inmunoglobulinas o inhiben la cascada alternativa del complemento u otras proteasas.

45 A pesar de la gran cantidad de bibliografía, sólo unos pocos artículos listan secuencias de ADNc identificadas por secuenciación aleatoria y cribados diferenciales de bibliotecas generadas a partir de varios tejidos y/o especies de garrapata. Sin embargo, la gran mayoría de estas secuencias no se han caracterizado bioquímicamente o funcionalmente, y se introducen muchas anotaciones sólo tomando como base la similitud de secuencia con proteínas conocidas implicadas en funciones celulares básicas, tales como las caracterizadas previamente en las glándulas salivares de las garrapatas para actividades enzimáticas o para inducir respuesta de anticuerpos. En particular, no hay ninguna indicación de proteínas de garrapata que actúen como proteínas de unión a la quimioquinas CXC y que funcionen como antagonistas de las quimioquinas CXC.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

50 De manera sorprendente, se ha encontrado que la saliva de *Rhipicephalus sanguineus* (garrapata de perros) contiene una nueva proteína denominada Evasina-3, que se une a las quimioquinas CXC e inhibe su actividad. La Evasina-3 se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de *Rhipicephalus sanguineus* y se expresó en células de mamífero y de *E. coli*. Esta proteína, así como derivados, fragmentos o miméticos de ésta, pueden usarse terapéuticamente, por ejemplo, como antagonistas de las quimioquinas CXC en organismos mamíferos, o como dianas para la vacunación y para el control de garrapatas y de patógenos transmitidos por garrapatas.

Un primer aspecto de la invención se refiere así a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la Evasina-3 o de un análogo de ésta. Los polipéptidos preferidos de esta invención se unen a una quimioquina CXC e inhiben su actividad biológica. Un ejemplo específico de dicho polipéptido es Evasina-3.

5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido como se ha definido anteriormente. Dichos ácidos nucleicos también incluyen oligonucleótidos asilados de ellos y vectores que contiene dichas moléculas, en particular vectores de expresión.

Un tercer aspecto de esta invención se basa en anticuerpos que se unen selectivamente a los polipéptidos como se han definido anteriormente.

10 Un cuarto aspecto de esta invención se refiere a células huésped que expresan un polipéptido como se ha definido anteriormente.

Un quinto aspecto de esta invención es un proceso para preparar un polipéptido como se ha definido anteriormente, usando típicamente tecnologías recombinantes.

15 Un sexto aspecto de la invención es una composición farmacéutica (incluyendo una vacuna o inmunogénica) que comprende un polipéptido como se ha definido anteriormente y un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente como un medicamento, en particular para la preparación de un medicamento para regular una respuesta inmune o inflamatoria en un mamífero.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de Evasina-3 con traducción del marco de lectura abierto (ORF). La secuencia señal (residuos 1-26), predicha por el algoritmo SIGNALP, está subrayada. El sitio de poliadenilación predicho está incluido en una caja. Los residuos de Cisteína presentes en la proteína madura están resaltados. Los sitios predichos de glicosilación asociada a N están en negrita.

25 Figura 2: Secuencia de nucleótidos y traducción del ADNc de Evasina-3 compatible Gateway que contiene sitios attB flanqueantes 5' y 3' generados por dos ciclos sucesivos de PCR. Las flechas indican la posición y sentido de los cebadores de PCR relevantes (las secuencias de los cebadores están listadas en la Tabla III). Los codones de inicio y de parada están en negrita. La secuencia señal predicha está subrayada.

30 Figura 3: (A) Mapa del vector de entrada Gateway pDONR221_Evasina-3-6HIS. (B) Mapa del vector de expresión Gateway pDEST8_Evasina-3-6HIS para expresión en células TN5 (insecto). (C) Mapa del vector de expresión Gateway pEAK12d_evasina3-6HIS para expresión en células de riñón embrionario humano HEK293/células EBNA. (D) Mapa del vector de expresión pEXPII-evasina3-6HIS para expresión en células HEK293/EBNA.

35 Figura 4: Autorradiografía del gel de SDS-PAGE que muestra el complejo formado por el entrecruzamiento de quimioquina CXC CXCL8 (IL-8) marcada con ^{125}I con sobrenadantes de células HEK293 transfectadas con Evasina-3 recombinante, usando el agente de entrecruzamiento BS3. Carril 1, la proteína viral de unión a quimioquina CC (p35) se entrecruza con ^{125}I -eotaxina como control positivo; Carril 2, la proteína viral de unión a quimioquina CC (p35) se incubó con ^{125}I -eotaxina en ausencia de BS3; Carril 3, sobrenadante del cultivo de células HEK293 del conjunto 69.19 incubado con ^{125}I -CXCL8/IL-8 y BS3.

40 Figura 5: Autorradiografía del gel de SDS-PAGE que muestra la competición para la formación del complejo de CXCL8/IL-8 no marcada y CXCL1/Gro- α con ^{125}I -CXCL8/IL-8. Las proteínas no marcadas se añadieron a la quimioquina CXC marcada radiactivamente (^{125}I -CXCL8/IL-8) en presencia del agente de entrecruzamiento (BS³). Los estándares de peso molecular (M) (en Kd) se indican en el lado izquierdo del gel. Carril 1, sobrenadante del cultivo de células HEK293 que expresan Evasina-3 recombinante entrecruzada con ^{125}I -CXCL8/IL-8; Carriles 2-11, sobrenadante de células HEK293 que expresan Evasina-3 recombinante entrecruzada con ^{125}I -CXCL8/IL-8 en presencia de 1 μg de CCL3/MIP-1 α (Carril 1), CXCL8/IL-8 (Carril 3), CXCL1/Gro- α (Carril 4), CXCL4/PF4 (Carril 5), CXCL7/NAP-2 (Carril 6), CXCL9/Mig (Carril 7), CXCL10/IP-10 (Carril 8), CXCL11/I-TAC (Carril 9), CXCL12/SDF-1 α (Carril 10) o CXCL13/BCA-1 (Carril 11), no marcadas.

50 Figura 6: Gel de SDS-poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie que muestra Evasina-3-HIS purificada de células HEK293 usando cromatografía de afinidad con Ni^{2+} . Carril 1, Marcadores de peso molecular; Carril 2, grupo de Evasina-3-6His recombinante después de elución de la columna de afinidad con Ni^{2+} .

Figura 7: Autorradiografía del gel de SDS-PAGE que muestra los complejos formados por el entrecruzamiento de quimioquinas marcadas con ^{125}I con Evasina-3-6His recombinante purificada. Carril 1, 40 ng de proteína viral de unión a quimioquina CC (p35) entrecruzada con MCP-1 (control positivo), Carriles 2-11, 10 ng de Evasina-3-6His

entrecruzada con Gro- α /CXCL1 (Carril 2); eotaxina/CCL11 (Carril 3); RANTES/CCL5 (Carril 4); TARC/CCL17 (Carril 5); MCP-1/CCL2 (Carril 6); IL-8/CXCL8 (Carril 7); IP-10/CXCL10 (Carril 8); CTACK/CCL27 (Carril 9); IL-2 (Carril 10); IL-1 α (Carril 11). Los complejos Evasina-3-6His se indican con flechas.

Figura 8: Alineamiento del ADNc de Evasina-3 que contiene los sitios de restricción 5' NdeI y 3' XhoI generados por PCR. Las flechas indican la posición y sentido de los cebadores de PCR relevantes (resumidos en la Tabla IV). Los codones de inicio están en negrita y los codones de parada en *italica*.

Figura 9: Mapa del vector pET30a-Evasina-3 usado para expresión en *Escherichia coli*.

Figura 10: Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que muestra la Evasina-3 purificada de *E. coli*. Los estándares de peso molecular se indican a la izquierda (M_R).

Figura 11: Autorradiografía del gel de SDS-PAGE que muestra los complejos formados por el entrecruzamiento de quimioquina CXC marcada con ¹²⁵I CXCL8/IL-8 con Evasina-3-6His recombinante expresada en HEK293 o Evasina-3 expresada en *E. coli*. Los estándares de peso molecular (Kd) se indican a la izquierda (M_R). Los complejos y la CXCL8/IL-8 yodada se indican con flechas.

Figura 12: A) Inhibición de la unión de ¹²⁵I-IL-8 a CXCR1 por Evasina-3-6His recombinante purificada de células HEK 293. El valor CI₅₀ es 1 nM.

B) Inhibición de la unión de ¹²⁵I-IL-8 a CXCR1 por Evasina-3 recombinante producida en *E. coli*. El valor CI₅₀ es 20 nM.

Figura 13: Efecto inhibitorio de Evasina-3-6His en la quimiotaxis inducida por IL-8 (A) y Gro-alfa (B) de neutrófilos humanos. Las unidades arbitrarias en el eje de las Y son proporcionales al número de células que han migrado. Los valores CI₅₀ son 16 nM para IL-8 y 20 nM para Gro-alfa.

Figura 14: Análisis SPR de la unión de quimioquinas CXC a A) Evasina-3-6His o B) Evasina-3 inmovilizada en un chip CM4. CXCL8/IL-8 (negro), Gro-alfa/CXCL1 (gris), CXCL1/KC murina (línea de puntos) y CXCL2/MIP-2 murina (gris claro) mostraron una unión positiva mientras que las otras quimioquinas ensayadas: CCL5/RANTES, CX3CL1/Fractalina, CCL11/eotaxina, CCL3/MIP-1-alfa, CCL4/MIP-1 β , CCL18/PARC, CCL2/MCP-1 y CXCL12/SDF-1-alfa fueron negativas.

Figura 15: Análisis cinético SPR de la unión de las quimioquinas CXC a Evasina-3-6His. Un experimento de titulación típico se muestra para las quimioquinas A) CXCL8/IL-8, B) Gro-alfa/CXCL1, C) CXCL1/KC murina y D) CXCL2/MIP-2 murina. Las curvas experimentales se ajustaron globalmente usando un modelo de ajuste de Langmuir para determinar los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 2.

Figura 16: Análisis cinético SPR de la unión a Evasina-3 de A) CXCL8/IL-8, B) Gro-alfa/CXCL1, C) CXCL1/KC murina y D) CXCL2/MIP-2 murina. Las curvas experimentales se ajustaron globalmente usando un modelo de ajuste de Langmuir para determinar los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 2.

Figura 17: Inhibición del reclutamiento de neutrófilos. La Evasina-1 se administró en la articulación de la rodilla de ratones 45 minutos antes de la administración de KC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas composiciones y métodos para regular la actividad quimioquina. Más particularmente, la presente invención describe una nueva proteína que tiene propiedades de unión a quimioquinas CXC, que puede usarse para inhibir la acción quimioquina. Los ejemplos muestran que esta proteína, obtenida de la saliva de garrapatas, puede expresarse y purificarse en forma recombinante y que se une eficazmente a las quimioquinas CXC e inhibirá así su acción, por ejemplo, la respuesta quimiotáctica específica de las células inducidas por una quimioquina CXC.

Un primer aspecto de la invención se basa así en un polipéptido Evasina-3, es decir, cualquier polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 o un análogo de ésta. Los polipéptidos preferidos de esta invención se unen a la quimioquina CXC, en particular CXCL8 (también referida como IL-8) e inhiben la actividad de dicha quimioquina. Los polipéptidos particulares de esta invención se seleccionan del grupo que consiste en:

a) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);

b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6) o de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26);

c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17); y

d) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18). También se describen los polipéptidos siguientes:

- e) una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de a), b), c) o d) bajo condiciones astringentes, codificando dicha molécula de ácido nucleico una proteína que se une a una quimioquina CXC e inhibe la actividad de dicha quimioquina;
- 5 f) una proteína al menos aproximadamente 70% idéntica en la secuencia de aminoácidos a una proteína de a), b), c) o d) y que se une a una quimioquina CXC e inhibe la actividad de dicha quimioquina;
- g) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c), d), e) o f), reteniendo este fragmento la capacidad de unirse a una quimioquina CXC e inhibir la actividad de dicha quimioquina; y
- h) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c), d), e) o f), teniendo este fragmento una actividad inmuno-moduladora.
- 10 En una realización preferida, la proteína se selecciona del grupo que consiste en:
- a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
- b) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6) o de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26);
- c) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17); y
- 15 d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18). También se describen los polipéptidos siguientes:
- e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), uniendo este fragmento una quimioquina CXC e inhibiendo la actividad de dicha quimioquina; y
- 20 f) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), teniendo este fragmento una actividad inmunomoduladora.
- En otro aspecto, la invención se refiere a un mutante activo de una proteína como se ha definido anteriormente, en el que en dicho mutante uno o más residuos de aminoácidos se han sustituido y en el que dicho mutante se une a una quimioquina CXC e inhibe la actividad de dicha quimioquina.
- 25 Los polipéptidos de la invención pueden estar en la forma madura, que resulta de una o más modificaciones posteriores a la traducción (glicosilación, fosforilación, modificación con endo/exopeptidasas para eliminar el péptido señal, por ejemplo) o de la adición en marco de secuencia que codifica secuencias heterólogas (tales como etiquetas o dominios que mejoran la detección y/o la purificación). Por ejemplo, la Evasina-3 puede expresarse como una proteína recombinante etiquetada con histidina en la forma completa (SEQ ID NO: 17) y madura (SEQ ID NO: 18), tanto en una línea celular de mamíferos como de insectos.
- 30 Los polipéptidos de esta invención o sus ácidos nucleicos correspondientes pueden estar en forma aislada (por ejemplo, no en su entorno natural), incluyendo polipéptidos y ácidos nucleicos recombinantes o sintéticos.
- Los ejemplos muestran que los polipéptidos Evasina-3 se unen a quimioquinas CXC, en particular CXCL8 (también denominada IL-8) y también a CXCL1 (también denominada Gro- α) pero no a quimioquinas CC tales como CCL2, CCL5, CCL11 o CCL17 y pueden usarse para inhibir (por ejemplo, reducir) su actividad. Esta caracterización se realizó usando una serie de ensayos bioquímicos, incluyendo el uso de quimioquinas CXC radiactivas. Como se demuestra en los ejemplos, los polipéptidos Evasina-3 se unen a quimioquinas CXC, en particular CXCL8/IL-8. Dicha actividad confiere a los polipéptidos Evasina-3 de esta invención un amplio rango de utilidad terapéutica, como se discute más adelante.
- 35 En el contexto de la presente descripción, un fragmento de un polipéptido designa cualquier fragmento que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos de aminoácidos consecutivos de dicha secuencia polipeptídica. Los fragmentos particulares de esta descripción comprenden 15, 20, 25 o más residuos de aminoácidos de una proteína Evasina-3 como se describe en esta memoria. Los fragmentos preferidos retienen al menos una actividad biológica de una proteína de longitud completa, por ejemplo, una actividad inmunogénica o una actividad inmunomoduladora.
- A este respecto, en el contexto de la presente descripción, una "actividad inmunomoduladora" designa cualquier actividad detectada *in vitro* o *in vivo* que afecta la respuesta inmune de una manera positiva o negativa. Los ejemplos de dichas actividades son actividades inmunizantes, actividades inmunosupresoras, actividades anti-inflamatorias, actividades pro/anti-apoptóticas o actividades anti-tumorales.
- 45 Alternativamente, el fragmento puede identificarse si proporciona actividad inmunizante cuando se administra a un mamífero. Estos fragmentos deben tener propiedades antigénicas, inmunogénicas apropiadas para incitar una respuesta inmune cuando se necesita (por ejemplo, frente a garrapatas u organismos patógenos transmitidos por garrapatas). La bibliografía proporciona muchos ejemplos de cómo dichas secuencias funcionales pueden identificarse como antígenos para vacuna candidatos y eventualmente administrarse con adyuvantes y/o
- 50

entrecruzados con un vehículo. (Mulenga A et al. 2000; WO 01/80881; WO 03/030931; WO 01/87270). Un antígeno o grupo de antígenos específicos identificados en Evasina-3 pueden usarse para prevenir o reducir la infección o enfermedad por ectoparásitos en un animal, de manera que la inmunidad del animal frente al ectoparásito se refuerza por el pulso natural del animal con el ectoparásito (WO 95/22603). Finalmente, el fragmento también puede usarse para incitar anticuerpos dirigidos frente a la proteína entera para aplicaciones de cribado o diagnósticas.

Las propiedades de Evasina-3 definidas anteriormente y ejemplificadas en la presente memoria usando variantes recombinantes de esta secuencia, pueden mantenerse, o incluso potenciarse, en los mutantes activos. Esta categoría de moléculas incluye análogos naturales o sintéticos de dicha secuencia, en los que uno o más residuos de aminoácidos se han añadido, delecionado o sustituido, siempre que muestren la misma actividad biológica caracterizada en la presente invención a niveles comparables o mayores, como se determina por los medios descritos en los Ejemplos más adelante.

En particular, el término "activo" significa que dichos compuestos alternativos deben mantener, o incluso potenciar, la unión a quimioquinas CXC y las propiedades inmoduladoras de la Evasina-3.

Las moléculas mutantes activas pueden generarse por técnicas de mutagénesis dirigida a sitio, tecnologías combinatorias al nivel de secuencia de ADN codificadora (tal como transposición de secuencias de ADN, exposición/selección en fagos) o por estudios de diseño por ordenador, o cualquier otra técnica conocida adecuada para esto, que proporcione un conjunto finito de péptidos o polipéptidos mutados o acortados sustancialmente correspondientes. Estas moléculas alternativas pueden obtenerse y ensayarse rutinariamente por un experto en la técnica usando las enseñanzas presentadas en la técnica anterior y en los Ejemplos más adelante.

Según la presente invención, los cambios preferidos en estos mutantes activos se conocen comúnmente como sustituciones "conservativas" o "seguras" e implican residuos no básicos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas con aminoácidos que tienen propiedades químicas suficientemente similares, con el fin de mantener la estructura y la función biológica de la molécula. Está claro que también pueden hacerse inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias definidas anteriormente sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones sólo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de diez, y preferiblemente menos de tres y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para la conformación funcional de una proteína o un péptido.

La bibliografía proporciona muchos modelos en los que la selección de sustituciones de aminoácidos conservativas puede realizarse tomando como base estudios estadísticos y físico-químicos sobre la secuencia y/o la estructura de la proteína natural (Rogov SI y Neksarov AN, 2001). Los experimentos de diseño de proteínas han mostrado que el uso de subconjuntos específicos de aminoácidos puede producir proteínas que se pueden plegar y activas, lo que ayuda en la clasificación de sustituciones de aminoácidos "sinónimas" que pueden acomodarse más fácilmente en la estructura de la proteína y que pueden usarse para detectar homólogos y parálogos de la Evasina-3 funcionales y estructurales (Murphy LR et al., 2000). Los grupos de aminoácidos sinónimos y los grupos sinónimos más preferidos para las sustituciones son los definidos en la Tabla I.

Sin embargo, en el contexto de la secuencia de la Evasina-3, pueden tener una importancia particular residuos específicos. Por ejemplo, la Evasina-3 no es significativamente homóloga a ninguna proteína conocida pero contiene un número par de residuos de cisteína en la proteína madura, en particular en la posición correspondiente a 22, 26, 33, 37, 39 y 50 de la Evasina-3 madura. Además, la Evasina-3 contiene sitios de glicosilación potenciales en la posición correspondiente a la Asparagina 25 y 56 en la Evasina-3 madura. Estos residuos pueden ser importantes para el plegamiento y/o actividad correctas y deben conservarse preferiblemente en las posiciones correspondientes de estos polipéptidos alternativos. Alternativamente, las cisteínas o los sitios de glicosilación delecionados o sustituidos pueden reestablecerse en una posición diferente de la proteína.

Alternativamente, los mutantes activos de la Evasina-3 pueden resultar de alteraciones de la secuencia que reducen la inmunogenicidad de dicha proteína de unión a quimioquinas CXC cuando se administra a un mamífero. La bibliografía proporciona muchos ejemplos de estas alteraciones de secuencia que pueden diseñarse e introducirse en este ámbito o para otras optimizaciones funcionales que permiten una administración segura y eficaz de una proteína terapéutica, especialmente cuando es una proteína no humana, no de mamíferos o no natural (Schellekens H, 2002). Los ejemplos de estrategias técnicas para conseguir estas moléculas son evolución dirigida (Vasserot AP et al., 2003), diseño racional (Marshall SA et al., 2003), bioinformática (Gendel M, 2002), la identificación y la neutralización de epítomos CD4+ de células T (WO 03/104263; WO 03/006047; WO 02/98454; WO 98/52976; WO 01/40281), fusión con otras secuencias de proteína (WO 02/79415; WO 94/11028) o conjugación con otros compuestos (WO 96/40792).

Las secuencias obtenidas de Evasina-3 activas pueden ser análogos u ortólogos naturales de la Evasina-3 que pueden aislarse, en particular, de otras especies de garrapata, en particular aquellas que pertenecen a la familia *Ixodidae*, y más en particular a la subfamilia *Rhipicephalinae*, a la que pertenece *Rhipicephalus sanguineus*, así como a otras subfamilias como *Ixodinae* (incluyendo *Ixodes scapularis* e *Ixodes ricinus*) o *Amblyomminae* (incluyendo *Amblyomma variegatum* y *Amblyomma americanum*). Alternativamente, los ortólogos pueden identificarse en mamíferos, tales como el ser humano y el ratón.

Está disponible una información limitada sobre el genoma y el transcriptoma de los artrópodos hematófagos y está asociada mayoritariamente con secuencias ribosomales y mitocondriales, que se estudiaron para determinar las relaciones filogenéticas tomando como base su conservación (Murrell A et al., 2001). Los datos genómicos de la garrapata están disponibles sólo en formatos parciales y preliminares (Ullmann AJ et al., 2002) pero los análisis adicionales de los genes de garrapata que codifican proteínas de unión a quimioquinas CXC pueden realizarse usando ADN genómico que puede extraerse de garrapatas ixodid aplicando métodos y condiciones específicas (Hill CA y Gutierrez JA 2003), en particular para detectar cualquier polimorfismo significativo en las proteínas de la glándula salivar, como ya se ha demostrado (Wang H et al., 1999). Las secuencias genómicas y proteicas de estos organismos son importantes para entender su fisiología y biología, proporcionando por lo tanto información útil para entender el papel de las proteínas de la invención en las relaciones huésped, parásito y patógenos transmitidos por el parásito (Valenzuela JG, 2002b).

La caracterización bioquímica y fisiológica de las actividades de unión de quimioquinas CXC descritas para proteínas homólogas a la Evasina-3 en la presente invención pueden realizarse aplicando cualquiera de las tecnologías recientemente mejoradas para el estudio de garrapatas y patógenos transmitidos por garrapatas, tales como electroforesis en gel bidimensional (Madden RD et al., 2004) o interferencia de ARN (Aljamali MN et al., 2003). Además, pueden realizarse estudios adicionales para mapear el sitio de reconocimiento de la quimioquina CXC en estas proteínas y los mecanismos del antagonismo de las quimioquinas CXC (Seet BT et al., 2001; Beck CG et al., 2001; Burns JM et al., 2002; Webb LM et al., 2004) o para identificar modificaciones posteriores a la traducción relevantes (Alarcon-Chaidez FJ et al., 2003).

Otro aspecto de la invención son proteínas de fusión que comprenden un polipéptido Evasina-3 como se ha definido anteriormente unido de manera operativa con un dominio heterólogo, por ejemplo, una o más secuencias de aminoácidos que pueden elegirse entre las siguientes: un dominio extracelular de una proteína unida a membrana, regiones constantes de inmunoglobulina (región Fc), dominios de multimerización, señales de exportación y secuencias etiqueta (tal como las que ayudan en la purificación por afinidad; etiqueta HA, etiqueta de histidina, GST, péptidos FLAAG o MBP).

En el contexto de una proteína de fusión, la expresión "unido de manera operativa" indica que el polipéptido Evasina-3 y las secuencias de aminoácidos adicionales están asociadas mediante unión o uniones peptídicas bien directamente o mediante residuos espaciadores (por ejemplo, un conector). De esta manera, la proteína de fusión puede producirse de manera recombinante, por expresión directa en una célula huésped de una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, como se discutirá más adelante. También, si se necesita, las secuencias de aminoácidos adicionales incluidas en la proteína de fusión pueden eliminarse, bien al final del proceso de producción/purificación o *in vivo*, por ejemplo mediante una endo/exopeptidasa apropiada, como se discutirá más adelante. El resto heterólogo puede unirse de manera operativa bien a la parte N o C terminal del polipéptido Evasina-3.

El diseño de restos y/o conectores, así como métodos y estrategias para la construcción, purificación, detección, maduración y uso de las proteínas de fusión se discuten ampliamente en la bibliografía (Nilsson J et al., 1997; "Applications of chimeric genes and hybrid proteins" Methods Enzymol. Vol. 326-328; Academic Press, 2000). En general, se pretende que las secuencias heterólogas proporcionen propiedades adicionales sin perjudicar la actividad terapéutica de la proteína original (unión a quimioquinas CXC, por ejemplo) de una manera significativa. Los ejemplos de dichas propiedades adicionales son un procedimiento más sencillo de purificación, una vida media mayor en los fluidos corporales, un resto de unión adicional, la maduración mediante una digestión endoproteolítica, la estabilidad durante la producción recombinante o localización extracelular. Esta última característica tiene una importancia particular para definir un grupo específico de proteínas de fusión o quiméricas incluido en la definición anterior ya que permite que estos polipéptidos se localicen en el espacio donde se facilita el aislamiento y purificación de estos polipéptidos y donde las quimioquinas CXC son activas normalmente.

La elección de una o más de estas secuencias para fusionarse con un polipéptido Evasina-3 depende del uso y/o protocolo de purificación específico de dicha proteína como proteína recombinante. Por ejemplo, la actividad de la Evasina-3 se ensayó en los ejemplos mediante una proteína de fusión que incluye una secuencia de etiqueta de histidina que facilita tanto la detección como la purificación de la Evasina-3. Estas secuencias pueden elegirse entre los tres grupos básicos siguientes de secuencias heterólogas.

Un primer grupo de dichas secuencias consiste en secuencias que ayudan en la secreción y la purificación de la proteína usando tecnologías de ADN recombinante, tales como un péptido señal y señales de exportación (Rapoport TA et al., 1996) o secuencias etiqueta que ayudan en la purificación por afinidad (Etiqueta HA, etiqueta de histidina, GST, FLAG o MBP).

Un segundo grupo de secuencias heterólogas está representado por aquellas que permiten una mejor estabilidad y bioactividad de las proteínas.

Un ejemplo típico de una estrategia que permite una vida media prolongada de una proteína es la fusión con albúmina de suero humano o con péptidos y otras secuencias modificadas (por ejemplo, por miristoilación) que permiten la unión a albúmina de suero humano circulante (Chuang VT et al., 2002; Graslund T et al., 1997; WO

01/77137). Alternativamente, la secuencia adicional puede ayudar en el direccionamiento a una localización específica, tal como en el cerebro (WO 03/32913).

Otra manera de mejorar la estabilidad de una proteína recombinante cuando se administra a un sujeto es generar multímeros de la proteína por dominios de fusión aislados de otras proteínas que permiten la formación de dímeros, trímeros, etc. Los ejemplos de secuencias de proteínas que permiten la multimerización de los polipéptidos de la invención son dominios aislados de proteínas tales como hCG (WO 97/30161), colágeno X (WO 04/33486), C4BP (WO 04/20639), proteínas Erb (WO 98/02540) o péptidos superenrollados (WO 01/00814).

Un ejemplo muy conocido de dichas proteínas de fusión está representado por la región constante/Fc de las proteínas inmunoglobulinas humanas, que permite la dimerización común de las inmunoglobulinas humanas. En la bibliografía se describen diferentes estrategias para generar proteínas de fusión que comprenden una proteína terapéutica y un fragmento de inmunoglobulina (WO 91/08298 WO 96/08570; WO 93/22332; WO 04/085478; WO 01/03737, WO 02/66514). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la Evasina-3 madura puede clonarse en un vector de expresión fusionada con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia señal original de la Evasina-3 (u otra secuencia señal/de exportación apropiada) en su extremo 5' y la secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena pesada lambda de la inmunoglobulina IgG1 humana (NCBI No. Reg. CAA75302; segmento 246-477) en su extremo 3'. El vector resultante puede usarse para transformar una línea celular huésped CHO o HEK293 y pueden seleccionarse los clones que expresan de manera estable y secretan la proteína de fusión recombinante que tiene Evasina-3 en su N terminal y la secuencia de IgG1 en el C terminal. Este clon puede usarse para aumentar de escala la producción y para purificar la proteína de fusión recombinante del medio de cultivo. Alternativamente, la posición del ácido nucleico que codifica la región constante de la cadena pesada lambda de la inmunoglobulina IgG1 humana y la Evasina-3 pueden invertirse y la proteína resultante puede expresarse y secretarse usando aún la secuencia señal original de la Evasina-3, o cualquier otra secuencia señal/de exportación apropiada. Usando esta tecnología también puede ser posible generar heterodímeros si dos construcciones diferentes que expresan una proteína de fusión Evasina-3-Fc y la otra una proteína de fusión basada en Fc diferente (por ejemplo otro antagonista de quimioquinas CXC) se co-expresan en la misma célula huésped (WO 00/18932).

Un grupo adicional de secuencia heterólogas está representado por aquellas que añaden una actividad funcional adicional que puede actuar sinérgicamente o amplificar las mostradas por Evasina-3. Estas secuencias, que se espera que estén aisladas de un dominio extracelular de una proteína unida a membrana (tal como un receptor de quimioquina CXC) o que estén presentes en una proteína secretada, pueden ser activas como un antagonista de quimioquinas CXC y, en general, deberían tener una actividad inmunomoduladora.

Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia adicional incluida en las proteínas de fusión puede eliminarse, por ejemplo, al final del proceso de producción o purificación, o *in vivo*, si se necesita, por ejemplo, mediante una endo/exopeptidasa apropiada. Por ejemplo, la secuencia conectora incluida en la proteína recombinante puede presentar un sitio de reconocimiento para una endopeptidasa (tal como una caspasa) que puede usarse para separar enzimáticamente la proteína deseada de la secuencia heteróloga bien *in vivo* o *in vitro*. Alternativamente, si la secuencia proteica que se quiere expresar no contiene una metionina de inicio (por ejemplo, si la secuencia codifica sólo la secuencia madura de la proteína, sin el péptido señal), una proteína de la invención puede expresarse correctamente en una célula huésped con una Metionina de inicio. Este aminoácido adicional puede mantenerse en la proteína recombinante resultante o eliminarse mediante una exopeptidasa, tal como Metionina Aminopeptidasa, según los métodos descritos en la bibliografía (Van Valkenburgh HA y Kahn RA, 2002; Ben-Bassat A, 1991).

Pueden obtenerse variantes y análogos adicionales de los polipéptidos descritos en la presente memoria en la forma de miméticos de péptidos (también denominados peptidomiméticos), en los que la naturaleza del péptido o polipéptido se ha modificado químicamente a nivel de las cadenas laterales de los aminoácidos, de la quiralidad de los aminoácidos y/o del núcleo peptídico. Se pretende que estas alteraciones proporcionen antagonistas con características mejoradas de purificación, potencia y/o farmacocinética. Por ejemplo, cuando la susceptibilidad del péptido a escisión por peptidasas después de la inyección al sujeto es un problema, la sustitución de un enlace peptídico particularmente sensible por un mimético peptídico no escindible puede proporcionar un péptido más estable y así más útil como un terapéutico. De manera similar, la sustitución de un residuo de L-aminoácido es una manera estándar de hacer que el péptido sea menos sensible a proteólisis y finalmente más similar a compuestos orgánicos distintos de los péptidos. También son útiles los grupos bloqueantes amino terminales tales como t-butoxicarbonilo, acetilo, teilo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelailo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmtoxycarbonilo, metoxiazelailo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4-dinitrofenilo. En la técnica se conocen muchas modificaciones más que proporcionan potencia incrementada, actividad prolongada, facilidad de purificación y/o vida media incrementada (WO 02/10195, Villain M et al., 2001). Una alternativa preferida, los grupos "sinónimos" para derivados de aminoácidos incluidos en los miméticos peptídicos son aquellos definidos en la Tabla II. Por "derivado de aminoácido" se pretende un aminoácido o entidad química semejante a aminoácido distinta de uno de los 20 aminoácidos naturales codificados genéticamente. En particular, el derivado de aminoácido puede contener restos alquilo sustituidos o no sustituidos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y pueden incluir uno o más heteroátomos. Los derivados de aminoácidos pueden prepararse de novo u obtenerse a partir de fuentes comerciales (Calbiochem-Novabiochem AG, Suiza; Bachem, EEUU). Las técnicas para la síntesis y el desarrollo de

miméticos peptídicos, así como miméticos no peptídicos, son muy conocidas en la técnica (Hruby VJ y Balse PM, 2000; Golebiowski A et al., 2001). En la bibliografía también se describen varias metodologías para incorporar aminoácidos no naturales en proteínas, usando sistemas de traducción tanto in vitro como in vivo, para sondear y/o mejorar la estructura y función de las proteínas (Dougherty DA, 2000).

- 5 Como se discutirá más adelante, los polipéptidos de la invención pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo tecnologías recombinantes y tecnologías de síntesis química.

En un aspecto adicional, la invención se basa en una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se ha definido anteriormente, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la Evasina-3 o de un análogo de ésta. Las moléculas de ácido nucleico particulares de esta invención se seleccionan del grupo que consiste en:

- 10 a) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
- b) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6) o de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26);
- 15 c) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17); y
- d) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18). También se describen las moléculas de ácido nucleico siguientes:
- 20 e) una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar con una molécula de ácido nucleico de a), b), c) o d) bajo condiciones astringentes, y que codifica una proteína que se une a una quimioquina CXC;
- f) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína al menos aproximadamente 70% idéntica en la secuencia de aminoácidos a una proteína de a), b), c) o d) y que se une a una quimioquina CXC;
- 25 g) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende un fragmento de una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico de a), b), c), d), e) o f), uniéndose este fragmento a una quimioquina CXC; y
- h) una variante degenerada de una molécula de ácido nucleico de a), b), c), d), e), f) o g).

En particular, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
- 30 b) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6) o de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26);
- c) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17); y
- d) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18). También se describen las moléculas de ácido nucleico que codifican:
- 35 e) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), uniendo este fragmento una quimioquina CXC;
- f) una proteína que comprende un fragmento de una proteína de a), b), c) o d), teniendo este fragmento una actividad inmunomoduladora;
- g) un mutante activo de una proteína de a), b), c) o d), en este mutante se han añadido, delecionado o sustituido uno o más residuos de aminoácidos y uniendo dicho mutante una quimioquina CXC; y
- 40 h) una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión una proteína de a), b), c), d), e), f) o g) unida de manera operativa a una o más secuencias de aminoácido elegidas entre las siguientes: un dominio extracelular de una proteína unida a membrana, una región constante de inmunoglobulina, un dominio de multimerización, un péptido señal, una señal de exportación y una secuencia etiqueta.

45 En el contexto de la presente descripción, una "variante degenerada" designa todas las secuencias de ácido nucleico que, gracias a la degeneración del código genético, codifican la misma secuencia de aminoácidos que un ácido nucleico de referencia.

Además, el término "molécula de ácido nucleico" engloba todos los tipos diferentes de ácidos nucleicos, incluyendo sin limitación ácidos desoxirribonucleicos (por ejemplo, ADN, ADNc, ADNg, ADN sintético, etc.), ácidos ribonucleicos

(por ejemplo, ARN, ARNm, etc.) y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN, tal como una molécula de ADN bicatenaria, típicamente un ADNc.

Si los aspectos principales están dirigidos al ADN y las secuencias proteicas de Evasina-3 descritas en los ejemplos, las realizaciones específicas incluyen una serie de secuencias relacionadas con Evasina-3, tal como secuencias de ADN o ARN capaces de hibridar bajo condiciones moderadamente estrictas (disolución de pre-lavado de 5 X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0) y condiciones de hibridación de 50°C, 5X SSC, toda la noche) con las secuencias de ADN que codifican Evasina-3 y que codifican una proteína de unión a quimioquinas CXCR.

Por ejemplo, la invención proporciona la secuencia del ADNc de *Rhipicephalus sanguineus* que expresa Evasina-3 (SEQ ID NO: 3), el Marco de Lectura Abierto asociado (ORF; SEQ ID NO: 4), una secuencia de ADNc modificada que permite la expresión de Evasina-3 como una proteína recombinante fusionada con una etiqueta de histidina en células huésped de mamífero o insecto (SEQ ID NO: 15).

En otras realizaciones preferidas de la presente descripción, las secuencias de Evasina-3 son moléculas de ADN que codifican proteínas que son al menos 70%, preferiblemente 80% y, lo más preferiblemente, 90% idénticas en la secuencia de aminoácidos a Evasina-3. Este valor puede calcularse con cualquiera de los programas especializados, tal como FASTA (Pearson WR, 2000) y, para secuencias de fragmento o parciales, se calcula en la parte de la Evasina-3 que está presente en el fragmento.

Otra realización preferida de la presente descripción es un oligonucleótido que comprende un fragmento de, o que hibrida específicamente con, una región de la secuencia de una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente. Dichos oligonucleótidos tienen típicamente una longitud entre 5 y 100 nucleótidos y pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en oligonucleótidos con una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, oligonucleótidos con una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, y oligonucleótidos con una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos. Estos oligonucleótidos pueden usarse para detectar (por PCR o transferencia Southern, por ejemplo) las secuencias no/codificadoras en transcritos que codifican Evasina-3 y secuencias relacionadas en una muestra o para generar y subclonar variantes recombinantes de Evasina-3, como se muestra en el ejemplo para el extremo 3' de los cebadores usados para subclonar y modificar la secuencia codificadora de Evasina-3 como una variante etiquetada con histidina (evasina3PCR directo e inverso; SEQ ID NO: 7 y 8).

En un aspecto adicional, las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente pueden estar comprendidas en un vector de clonación o de expresión. A este respecto, una realización particular de esta invención se basa en un vector de expresión que comprende un promotor asociado de manera operativa con una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, en particular un promotor específico de tejido, constitutivo o promotor regulado (por ejemplo, inducible). El vector puede comprender cualquier elemento regulador adicional, tal como un terminador, amplificador, origen de replicación, marcador de selección, etc. El vector puede ser un plásmido, fagémido, cósmido, vector viral, fago, cromosoma artificial y semejante.

En una realización particular, este vector puede comprender:

- a) un ADN de la invención; y
- b) un casete de expresión;

en el que dicho ADN (a) está asociado de manera operativa con un promotor específico de tejido, un promotor constitutivo o inducible incluido en la secuencia (b).

Opcionalmente, si el ácido nucleico codificador (es decir, la secuencia (a)) no contiene un codón para una metionina de inicio (por ejemplo, si esta secuencia codifica sólo la secuencia madura de la proteína, sin el péptido señal), el vector o casete de expresión también puede contener una secuencia ATG que se clona en el 5' de dicha secuencia de manera que pueda expresarse correctamente con una Metionina de inicio. Este aminoácido adicional puede mantenerse en la proteína recombinante resultante o eliminarse mediante una enzima, tal como Metionina Aminopeptidasa, según los métodos descritos en la bibliografía (Van Valkenburgh HA y Kahn RA, 2002; Ben-Bassat A, 1991).

Este vector puede permitir la expresión de las proteínas de la invención no sólo en la condición de cultivo de tejido sino también *in vivo*, por razones experimentales o terapéuticas. Por ejemplo, las células que sobreexpresan la proteína de la invención pueden transferirse (por ejemplo, encapsuladas) en un modelo animal para comprobar los efectos fisiológicos de la administración constante de la proteína y eventualmente antes de aplicar las células a los seres humanos. Alternativamente, el vector puede usarse para la transferencia génica mediada por retrovirus, o cualquier otra tecnología que permita la introducción y expresión de un vector o de la secuencia de ADN codificadora aislada en animales bajo el control de un promotor endógeno. Esta estrategia permite la generación de animales no humanos transgénicos en los que las proteínas de la invención se expresan constitutivamente o de una manera regulada (por ejemplo, en tejidos específicos y/o después de la inducción con compuestos específicos). Se han aplicado estrategias similares a otras proteínas de unión a quimioquinas no de mamíferos, mostrando varios efectos en el desarrollo y patológicos (Jensen KK et al., 2003; Pyo R et al., 2004; Bursill CA et al., 2004).

Otro aspecto de la invención son células huésped transformadas o transfectadas con un vector de clonación o expresión indicado anteriormente. Estos vectores pueden usarse en un proceso de preparación de los polipéptidos de la invención. A este respecto, un aspecto de la invención es un método para preparar un polipéptido Evasina-3 como se ha definido anteriormente, que comprende cultivar células recombinantes como se han definido anteriormente bajo condiciones que permitan o estimulen la expresión y recuperación del polipéptido Evasina-3. Cuando el vector expresa el polipéptido como una proteína secretada en el espacio extracelular, la proteína puede recogerse y purificarse más fácilmente de las células cultivadas a la vista de un procesamiento adicional.

Muchos libros y revisiones proporcionan enseñanzas de cómo clonar y producir proteínas recombinantes usando vectores y células huésped Procariotas y Eucariotas, tales como algunos títulos en la serie "A Practical Approach" publicado por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001). En particular, los ejemplos muestran como, una vez que la secuencia de ADN que codifica Evasina-3 se ha identificado por cribado de la biblioteca de ADNc de *Rhipicephalus sanguineus*, el ORF puede adaptarse, modificarse e insertarse en vectores de expresión para obtener la proteína recombinante correspondiente.

En general, los vectores pueden ser vectores de integración episomales o no/homólogos, que pueden introducirse en las células huésped apropiadas por cualquier medio adecuado (transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplasto, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.) para transformarlas. Los factores importantes para seleccionar un vector plasmídico, viral o retroviral particular incluyen: la facilidad con la que las células receptoras que contienen el vector pueden reconocerse y seleccionarse de aquellas células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desea en un huésped particular; y si es deseable poder "lanzar" el vector entre las células huésped de diferentes especies. Los vectores deberían permitir la expresión de las proteínas aisladas de la invención, o de las proteínas de fusión que las comprenden en la célula huésped procariota o Eucariota bajo el control de secuencias reguladoras del inicio/terminación de la transcripción apropiadas, que se eligen para ser constitutivamente activas o inducibles en dicha célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células puede aislarse para proporcionar una línea celular estable (como se muestra en el ejemplo con las líneas celulares HEK293 y TN5).

Para las células huésped eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero), pueden emplearse diferentes secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, dependiendo de la naturaleza del huésped. Pueden obtenerse de fuentes virales, tal como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus de Simios o semejantes, en los que las señales reguladoras están asociadas con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Los ejemplos son el promotor TK del virus del Herpes, el promotor temprano de SV40, el promotor del gen gal4 de levaduras, etc. Las señales reguladoras del inicio de la transcripción pueden seleccionarse para permitir la represión y activación, de manera que puede modularse la expresión de los genes. Las células, que se han transformado de manera estable con el ADN introducido, pueden seleccionarse introduciendo también uno o más marcadores, que permitan la selección de las células huésped que contienen el vector de expresión. El marcador también puede proporcionar fototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas, por ejemplo, antibióticos, o metales pesados tal como cobre, o semejantes. El gen del marcador seleccionable puede estar unido directamente a las secuencias génicas de ADN que se van a expresar o introducirse en la misma célula por co-transfección. También pueden necesitarse elementos adicionales para la síntesis óptima de las proteínas de la invención.

Las células huésped para la producción recombinante pueden ser células procariotas o eucariotas. Las células procariotas particularmente adecuadas incluyen bacterias (tal como *Bacillus subtilis* o *E. coli*) transformadas con un vector de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinante. Se prefieren las células huésped eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, tales como células humanas, de mono, de ratón y de ovario de hámster chino (CHO), porque proporcionan modificaciones posteriores a la traducción a las moléculas proteicas, incluyendo el plegamiento correcto o la glicosilación en los sitios correctos. Las células huésped eucariotas alternativas son células de levadura transformadas con vectores de expresión de levaduras. Las células de levadura también pueden realizar modificaciones en los péptidos posteriores a la traducción incluyendo glicosilación. Existen varias estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y plásmidos con alto número de copias que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce secuencias líder en productos génicos de mamífero clonados y secreta péptidos que presentan secuencias líder (es decir, pre-péptidos).

Para la producción a largo plazo, con alto rendimiento de un polipéptido recombinante, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares, que expresan de manera estable el polipéptido de interés, pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen de marcador seleccionable en el mismo vector o en otro vector. Después de la introducción del vector, las células pueden crecerse durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de las células que expresan de manera exitosa las secuencias introducidas. Los clones resistentes de las células transformadas de manera estable pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en dichas células puede aislarse para proporcionar una línea celular estable.

Un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención es mediante el uso de la amplificación con dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR, mediante el uso de niveles sucesivamente crecientes de metotrexato como se describe en US 4.889.803. El polipéptido obtenido puede estar en una forma glicosilada.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) incluyendo, pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón de mono (COS), C127, 3T3, HEK 293, melanoma de Bowes y carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias líneas celulares más. En el sistema de baculovirus, los materiales para los sistemas de expresión en células de insecto con baculovirus están disponibles comercialmente en forma de kit, entre otros, en Invitrogen.

Alternativamente, los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden prepararse por síntesis artificial. A este respecto, los ejemplos de tecnologías de síntesis química son síntesis en fase sólida y síntesis en fase líquida. Como una síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo carboxi del péptido que se quiere sintetizar se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos y por la repetición alternativa de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de la cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno con orden desde el extremo carboxi al extremo amino y uno en el que los aminoácidos unidos a la resina o el grupo protector de los grupos amino de los péptidos se liberan, la cadena peptídica se extiende así de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican generalmente por el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector usado. Los grupos protectores usados típicamente incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), BzL (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrido), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (trilito), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl2-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO2 (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Después de la síntesis del polipéptido deseado, éste se somete a la reacción de desprotección y escisión del soporte sólido. Dicha reacción de escisión del péptido puede realizarse con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc y con TFA para el método Fmoc. Las proteínas totalmente sintéticas con un tamaño comparable al de Evasina-3 se describen en la bibliografía (Brown A et al., 1996).

Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden producirse, formularse, administrarse o usarse genéricamente en otras formas alternativas que pueden preferirse según el método deseado de uso y/o de producción. La proteína de la invención puede modificarse posteriormente a la traducción, por ejemplo, por glicosilación como se muestra en los ejemplos.

En general, la proteína descrita en la presente memoria puede proporcionarse en la forma de fracciones, precursores, sales, derivados, conjugados o complejos activos.

Como se ha indicado anteriormente, el término "activo" o "biológicamente activo" significa que dichos compuestos alternativos deben mantener, o incluso potenciar, la unión a quimioquinas CXC y/o las propiedades inmunomoduladoras de Evasina-3.

El término "fracción" se refiere a cualquier fragmento de la cadena polipeptídica del compuesto en sí mismo, solo o en combinación con moléculas relacionadas o residuos unidos a éste, por ejemplo residuos de azúcares o fosfatos. Dichas moléculas también pueden resultar de otras modificaciones que normalmente no alteran la secuencia primaria, por ejemplo, derivatización química *in vitro* de péptidos (acetilación o carboxilación) y aquellas hechas modificando la proteína después de la traducción, tales como por fosforilación (introducción de residuos fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina) o por glicosilación (exponiendo el péptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamíferos) durante su síntesis y/o en etapas adicionales de procesamiento. En particular, la Evasina-3 se ha caracterizado en la saliva de las garrapatas y en ambas formas recombinantes descritas en la presente memoria como más o menos fuertemente glicosilada. Esta modificación puede realizarse *in vitro*, usando la enzima de modificación apropiada o *in vitro*, eligiendo las células huéspedes apropiadas para la producción recombinante.

Los "precursores" son compuestos que pueden convertirse en los compuestos de la presente invención por procesamiento metabólico y enzimático antes o después de la administración en las células o en el cuerpo.

El término "sales" en la presente memoria se refiere tanto a las sales de los grupos carboxilo como a las sales de adición a ácido de los grupos amino de los péptidos, polipéptidos, o análogos de éstos, de la presente invención. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y semejantes, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y semejantes. Las sales de adición a ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico.

Cualquiera de dichas sales debe tener una actividad sustancialmente similar a los péptidos y polipéptidos de la invención o sus análogos.

El término "derivados" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a derivados que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos de aminoácidos o en los grupos amino o carboxi terminales según métodos conocidos. Dichos derivados incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados N-acilo de los grupos amino libres o derivados O-acilo de los grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanóilo o aroílo.

Las proteínas descritas en la presente memoria pueden estar en la forma de un conjugado o complejo activo con una molécula elegida entre marcadores radiactivos, biotina, marcadores fluorescentes, agentes citotóxicos y agentes de administración de fármacos. Los conjugados o complejos útiles pueden generarse usando moléculas y métodos conocidos en la técnica, por varias razones, por ejemplo, para permitir la detección de la interacción con quimioquinas CXC u otras proteínas (marcadores radiactivos o fluorescentes, biotina), eficacia terapéutica (agentes citotóxicos) o mejorar los agentes en términos de eficacia de la administración de fármacos, tal como polietilen glicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris JM y Chess RB, 2003; Greenwald RB et al., 2003; Pillai O y Panchagnula R, 2001). A este respecto, la presente descripción contempla polipéptidos y proteínas modificados químicamente como se describe en la presente memoria, en los que el polipéptido o la proteína están unidos con un polímero. Típicamente, el polímero es soluble en agua de manera que el conjugado no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación, o un aldehído para alquilación. De esta manera, puede controlarse el grado de polimerización. Un ejemplo de un aldehído reactivo es polietilen glicol propionaldehído, o mono-alcoxi (C1-C10), o derivados ariloxi de éstos (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o no ramificado. Además, una mezcla de polímeros puede usarse para producir los conjugados. Los conjugados usados para terapia pueden comprender restos de polímeros solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilen glicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi (C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona) PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilen glicol, un co-polímero polipropilenoóxido/óxido de etileno, polioles polioxi-etilados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua. Como una ilustración, el polipéptido o variante de Evasina-3 de la presente invención puede modificarse con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación puede realizarse por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, EP 0 154 316). Por ejemplo, la PEGilación puede realizarse por una reacción de acilación o por una reacción de alquilación con una molécula de polietilen glicol reactiva. En una estrategia alternativa, los conjugados se forman condensando PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino terminal de PEG se ha reemplazado por un conector activado (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.382.657). El PEG puede ser lineal o ramificado. Estabiliza la proteína, puede incrementar la vida media y mejorar la bioactividad.

Estos compuestos derivados de Evasina-3 pueden producirse según una modificación dirigida a sitio de un residuo apropiado, en una posición interna o terminal. Los residuos pueden usarse para la unión, siempre que tengan una cadena lateral susceptible de unir el polímero (es decir, la cadena lateral de un aminoácido que presente un grupo funcional, por ejemplo, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, histidina, etc.). Alternativamente, un residuo en estos sitios puede reemplazarse por un aminoácido diferente que tenga una cadena lateral susceptible de unir el polímero.

Por ejemplo, puede añadirse una Cisteína adicional que permita la PEGilación directa en el extremo N o C terminal de la secuencia de la proteína madura por tecnologías de ADN recombinante o enzimáticamente. Alternativamente, la Cisteína puede incluirse en la proteína por la sustitución de un residuo, por ejemplo correspondiente a un sitio de glicosilación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente a las proteínas de la invención.

El término "anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria engloba anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos, biespecíficos o multiespecíficos así como fragmento de éstos tales como anticuerpos de cadena única (scFv) o anticuerpos con un único dominio, como se explica adicionalmente más adelante.

En el contexto de esta invención, el término unión "selectiva" indica que los anticuerpos se unen preferentemente al polipéptido o epítipo diana, es decir, con una mayor afinidad que cualquier unión a cualquier otro antígeno o epítipo. En otras palabras, la unión al polipéptido diana puede discriminarse de otra unión no específica a otros antígenos. Se prefiere que los anticuerpos según la presente invención presenten una afinidad de unión (K_a) frente a los polipéptido o epítipo diana de 10^6 M^{-1} o mayor, preferiblemente 10^7 M^{-1} o mayor, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o mayor y lo más preferiblemente 10^9 M^{-1} o mayor. La afinidad de la unión de un anticuerpo puede determinarla fácilmente un experto en la técnica, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Scatchard G., 1949).

Los anticuerpos de esta invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos o derivados de éstos que tienen sustancialmente la misma especificidad de antígeno.

Los métodos para preparar anticuerpos policlonales a partir de varias especies, incluyendo roedores, primates y caballos, se han descrito por ejemplo en Vaitukaitis *et al* (1971). Los anticuerpos policlonales pueden producirse en un mamífero, por ejemplo, por una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de SEQ ID NO: 5, 6, 17, 18 o una variante como se ha descrito anteriormente en la presente memoria o una proteína de fusión de éste. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero no están limitados a, hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de la soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trealosa sintético). Pueden realizarse inyecciones reiteradas. Las muestras de sangre se recogen y se separan las inmunoglobulinas o el suero.

Los anticuerpos pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular.

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales pueden encontrarse, por ejemplo, en Kohler *et al* (Nature 256 (1975) 495), incorporado en la presente memoria por referencia.

En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante (el agente inmunizante incluirá típicamente el polipéptido de SEQ ID NO: 5, 6, 17, 18 o una variante como se ha descrito anteriormente en la presente memoria o una proteína de fusión de éste o un vector de expresión que contiene la secuencia codificadora de dicha proteína) para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano o se usan células del bazo o de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding 1986). Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente líneas celulares de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no fusionadas, inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un nivel alto y estable de expresión del anticuerpo por las células seleccionadas que producen anticuerpo y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al péptido inmunizante. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica.

Después de que se han identificado las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitada y crecerse por métodos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecerse *in vivo* como ascites en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido de ascites por procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulinas tal como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

- Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente U.S. No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que se transfectan en células huésped tales como células de simio COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra manera la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.
- Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpo fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991 y Marks et al., 1991.
- Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc de manera que se evita el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo de aminoácido o se delecionan de manera que se evita el entrecruzamiento.
- Los métodos in vitro también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de éstos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.
- Los anticuerpos también pueden producirse por selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se describe por ejemplo en Ward et al (1989).
- Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes.
- Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. La humanización puede realizarse esencialmente según el método de Winter et al (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)), sustituyendo las CDR de roedores o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente U.S. No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.
- Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de exposición en fago (Hoogenboom y Winter, (1991). De manera similar, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo el loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcialmente o completamente. Después del pulso, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a lo observado en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución, ensamblaje génico y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.
- La descripción también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con restos heterólogos, tales como agentes citotóxicos, etiquetas, fármacos u otros agentes terapéuticos, unidos covalentemente o no, bien directamente o mediante el uso de agentes de acoplamiento o conectores. El agente citotóxico incluye agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de plantas o de animales, o fragmentos de ésta) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).
- Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de éstas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleutites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Están disponibles varios radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

El anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento tumoral en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

- 5 Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente descripción pueden PEGilarse usando métodos de la técnica y descritos en la presente memoria. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas con tiempo de circulación incrementado se describen en la Patente U.S. No. 5.013.556.

10 La descripción también se refiere a "fragmentos de anticuerpo" que comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, fragmentos bivalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; fragmentos monovalentes; fragmentos bivalentes, fragmentos monovalentes camelizados; anticuerpos con un único dominio y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

15 "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y unión. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación firme no covalente. Es en esta configuración cuando las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que
20 comprende sólo las tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en el que el o los residuos de cisteína de
25 los dominios constantes presentan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo. Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, tomando como base las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

30 Las "moléculas de anticuerpo de cadena única" son fragmentos de un anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL de dicho anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que la molécula de anticuerpo de cadena única forme la estructura deseada par la unión al antígeno.

35 El término "fragmentos divalentes" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos divalentes se describen más completamente, por ejemplo, en EP 404.097; WO 93/11161.

40 El término "fragmento monovalente" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de unión al antígeno con un dominio variable de cadena pesada y ningún dominio variable de cadena ligera. Un fragmento monovalente puede unirse a un antígeno en ausencia de cadenas ligeras y típicamente tiene tres regiones CDR designadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Un fragmento monovalente IgG de cadena pesada tiene tres moléculas de unión a antígeno de cadena pesada conectadas por un puente disulfuro. El dominio variable de la cadena pesada
45 comprende una o más regiones CDR, preferiblemente una región CDRH3.

Un "anticuerpo camelizado" se refiere a un fragmento monovalente o parte de unión a antígeno de éste obtenido de una fuente animal de la familia de los camélidos, incluyendo animales con pies con dos dedos y plantas coriáceas. Los animales de la familia de los camélidos incluyen camellos, llamas y alpacas. Se ha indicado que los camellos (Camelus dromedarius y Camelus bactrianus) carecen frecuentemente de los dominios variables de la cadena ligera
50 cuando se analiza material semejante a IgG de su suero, lo que sugiere que puede obtenerse una especificidad y afinidad de anticuerpo suficiente de los dominios VH (tres bucles CDR) solo.

También se incluyen en la descripción anticuerpos con un único dominio. Los anticuerpos con un único dominio, también denominados anticuerpos d con un único dominio o dAb, son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos, correspondiendo a las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL)
55 de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos con un único dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa o menos de un décimo el tamaño de un anticuerpo completo. A diferencia de los anticuerpos convencionales, los anticuerpos con un único dominio se expresan bien en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Además, muchos anticuerpos con un único dominio son altamente estables y retienen la

actividad incluso cuando se someten a condiciones duras, tales como liofilización o desnaturalización por calor lo que les hace susceptibles para un amplio rango de condiciones de formulación farmacéutica y procesos de fabricación.

5 Las proteínas de la invención pueden proporcionarse en formas más o menos purificadas. Los ejemplos muestran cómo clonar los ácidos nucleicos necesarios para expresar Evasina-3 recombinante, cómo purificar Evasina-3 recombinante o natural usando la afinidad para quimioquinas CXC y tecnologías cromatográficas y cómo seleccionar las células que expresan apropiadamente esta proteína mediante ensayos para detectar las actividades de unión a quimioquinas CXC, en particular las actividades de unión a CXCL8.

10 En particular, la purificación de los antagonistas naturales, sintéticos o recombinantes de la invención puede realizarse por uno cualquiera de los métodos conocidos para este propósito, es decir, cualquier procedimiento convencional que implica extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o semejantes. Un procedimiento de purificación adicional que puede usarse preferentemente para purificar la proteína de la invención es cromatografía de afinidad usando anticuerpos monoclonales o grupos de afinidad, que se unen a la proteína diana y que se producen e inmovilizan en una matriz de gel contenida en una columna. Las preparaciones impuras que contienen 15 las proteínas se pasan a través de la columna. La proteína se unirá a la columna por heparina o por el anticuerpo específico mientras que las impurezas pasaran a través de ella. Después de lavar, la proteína se eluye del gel por un cambio del pH o de la fuerza iónica. Alternativamente, puede usarse HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). La elución puede realizarse usando un disolvente basado en agua-acetonitrilo empleado comúnmente para la purificación de proteínas. Las preparaciones purificadas de las proteínas de la invención, tal y como se usa 20 en la presente memoria, se refiere a las preparaciones que son al menos 1% (en peso seco) y preferiblemente al menos 5% de dichas proteínas.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido Evasina-3 como se ha definido anteriormente (en la forma de proteínas y sus formas alternativas descritas anteriormente) como ingrediente activo y un diluyente o vehículo adecuado.

25 Otro aspecto de la presente descripción es una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido Evasina-3 como se ha definido anteriormente o un vector o célula huésped recombinante correspondiente y un diluyente o vehículo adecuado.

Un aspecto adicional de esta invención se refiere al uso de un polipéptido Evasina-3 como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para usarse en la regulación de una respuesta inmune en un 30 sujeto.

Estas composiciones pueden usarse como medicamentos, en particular, para regular una respuesta inmune o inflamatoria en un mamífero y, más particularmente, como compuestos anti-inflamatorios.

En general, dada la implicación de las quimioquinas CXC en muchos trastornos humanos y veterinarios, las proteínas de unión a quimioquinas CXC de la invención pueden usarse como antagonistas de las quimioquinas CXC 35 para el tratamiento o prevención de trastornos relacionados con quimioquinas CXC en animales. Una lista no exhaustiva de trastornos relacionados con quimioquinas CXC incluye: enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunes, infecciones, enfermedades alérgicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas, enfermedades gastrointestinales, enfermedades neurológicas, sepsia, enfermedades relacionadas con el rechazo de trasplantes o enfermedades fibróticas. Los ejemplos no limitativos de estas enfermedades son los siguientes: artritis, artritis reumatoide (AR), artritis psoriática, psoriasis, artritis reumatoide, 40 restenosis, sepsia, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis sistémica, escleroderma, polimiositis, glomerulonefritis, fibrosis, enfermedades alérgicas o de hipersensibilidad, dermatitis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, fibromas, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, choque séptico, infección viral, cáncer, endometriosis, trasplante, enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD), lesión por reperfusión cardíaca y renal y aterosclerosis. 45

En particular, las proteínas de unión a quimioquinas CXC de la invención pueden usarse para el tratamiento o prevención de la psoriasis.

Las proteínas de la invención pueden usarse como ingredientes activos en la fabricación de composiciones farmacéuticas para regular una respuesta inmune o inflamatoria en un mamífero, por ejemplo de composiciones anti-inflamatorias. Alternativamente, las proteínas de la invención pueden usarse como ingredientes activos en la 50 fabricación de composiciones farmacéuticas para la vacunación de un mamífero frente a parásitos, virus o bacterias. El proceso para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas comprende combinar la Evasina-3 junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica que contiene una proteína de la invención como ingrediente activo puede usarse 55 para unir una quimioquina CXC *in vivo*, bloqueando la unión de una quimioquina CXC a un receptor de la superficie celular correspondiente y consecuentemente produciendo un efecto potencialmente terapéutico, tal como un efecto anti-inflamatorio. Una composición farmacéutica que contiene una proteína de la invención como ingrediente activo, también puede usarse para unir análogos de quimioquinas CXC presentes en virus, bacterias o parásitos para

bloquear la entrada de dichos virus, bacterias o parásitos en las células. Las composiciones indicadas anteriormente pueden comprender además una sustancia inmunosupresora o anti-inflamatoria adicional.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener, en combinación con las proteínas de la invención como ingrediente activo, diluyentes, vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables, vehículos y aditivos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a un animal (por ejemplo, disolución salina fisiológica) y eventualmente puede comprender auxiliares (como excipientes, estabilizantes o adyuvantes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera aceptable para cumplir con las necesidades del modo de administración. Por ejemplo, el uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración, se describen en la bibliografía (Luo B y Prestwich GD, 2001; Cleland JL et al., 2001).

"Farmacéuticamente aceptable" se pretende que englobe cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el huésped al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, los ingredientes activos anteriores pueden formularse en forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como disolución salina, disolución de dextrosa, albúmina de suero y disolución de Ringer. Los vehículos también pueden seleccionarse de almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propilén glicol, agua, etanol, y los distintos aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo).

Puede usarse cualquier modo de administración aceptado y determinado por los expertos en la técnica para establecer los niveles en sangre deseados de los ingredientes activos. Por ejemplo, la administración puede ser por varias rutas parenterales tales como ruta subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, rectal, oral o bucal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de liberación lenta, bombas osmóticas, y semejantes, para la administración prolongada del polipéptido a una velocidad predeterminada, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración única de dosificaciones precisas.

La administración parenteral puede ser por inyección de bolo o por perfusión gradual en el tiempo. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica, y pueden prepararse según métodos rutinarios. Además, puede administrarse la suspensión de los compuestos activos como suspensiones apropiadas de inyección aceitosa. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones de inyección acuosas que pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, sorbitol, y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. Las composiciones farmacéuticas incluyen disoluciones adecuadas para la administración por inyección y contienen de aproximadamente 0,01 a 99,99 por ciento, preferiblemente de aproximadamente 20 a 75 por ciento de compuesto activo junto con el excipiente.

Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si existe, frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. La dosificación se personalizará al sujeto individual, como entiende y puede determinar el experto en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse por múltiples dosis o en una única dosis. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o conjuntamente con otros terapéuticos dirigidos a la afección o dirigidos a otros síntomas de la afección. Habitualmente una dosificación diaria del ingrediente activo está comprendida entre 0,01 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día. Ordinariamente, 1 a 40 miligramos por kilogramo por día proporcionados en dosis divididas o en forma de liberación sostenida es eficaz para obtener los resultados deseados. Las segundas o posteriores administraciones pueden realizarse a una dosificación, que es la misma, menor que o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo.

Otro aspecto de la descripción es el uso de una proteína codificada por un ADN de la invención como un medicamento, en particular en la preparación de una composición para regular una respuesta inmune o inflamatoria en un mamífero.

Aspectos adicionales de la descripción son métodos para inmunizar un animal frente a un ectoparásito que se alimenta de sangre o para regular una respuesta inmune o inflamatoria en un animal que lo necesite, que comprende administrar a dicho animal una proteína de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para regular dicha respuesta inmune.

Otro aspecto de la descripción es un método para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con quimioquinas CXC que comprenden la administración de una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de los ingredientes activos que es suficiente para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, dando lugar a la reducción o remisión de dicha patología. La cantidad eficaz dependerá de la ruta de administración y de la condición del paciente.

5 La expresión "enfermedades relacionadas con las quimioquinas CXC" indica cualquier enfermedad debida a una producción excesiva o incontrolada de quimioquinas CXC, que da lugar a una infiltración masiva de monocitos/macrófagos/neutrófilos/células T y en la que la administración de Evasina-3 puede proporcionar un efecto beneficioso. Una lista no exhaustiva de dichas enfermedades crónicas, agudas o heredadas se ha proporcionado anteriormente.

10 Las aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de las quimioquinas CXC de la invención y de los reactivos relacionados puede evaluarse (en términos de seguridad, farmacocinética y eficacia) mediante ensayos *in vivo* o *in vitro* usando células, tejidos y modelos de mamífero (Coleman R et al., 2001; Li A, 2001; Methods Mol. Biol. vol. 138, "Chemokines Protocols", editado por Proudfoot A et al., Humana Press Inc., 2000; Methods Enzymol. vol. 287 y 288, Academic Press, 1997). Una lista no limitativa de los ensayos incluye: movilización de calcio, desgranulación, regulación al alza de citoquinas pro-inflamatorias, regulación al alza de proteasas, inhibición del reclutamiento celular *in vitro* e *in vivo*.

15 Aspectos adicionales de la descripción son kits de ensayo que contiene cualquiera de los compuestos descritos en asociación con las proteínas de unión a quimioquinas CXC de la invención. Por ejemplo, un kit para detectar una quimioquina CXC o un análogo, una proteína de unión a quimioquinas CXC o un receptor, la interacción de quimioquinas CXC y una proteína de unión a quimioquinas CXC o antagonistas o agonistas de dicha interacción, comprendiendo un reactivo de detección y al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

a) Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ADN);

b) Un oligonucleótido;

c) Una proteína; y

d) Un anticuerpo;

25 obtenido de la proteína de unión a quimioquinas CXC de la invención.

Estos kits pueden usarse en métodos aplicables *in vitro* o *in vivo* en los que una muestra se pone en contacto con uno de estos compuestos, que puede estar marcado o inmovilizado en un soporte sólido.

30 La presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones, que puede realizar un experto en la técnica sin extenderse más allá del significado y propósito de las reivindicaciones.

La invención se describirá ahora mediante los Ejemplos siguientes, que no debe considerarse que limitan de ninguna forma la presente invención. Los Ejemplos se referirán a las Figuras especificadas aquí más adelante.

EJEMPLOS

35 **Ejemplo 1: Cribado de la biblioteca de ADNc de *Rhipicephalus sanguineus* para Actividades de Unión a Quimioquinas CXC y Clonación de Evasina-3**

Materiales y métodos

b. Construcción de la biblioteca de ADNc de *Rhipicephalus sanguineus* y del plásmido control que expresa vCCI

40 Se recogieron glándulas salivares de 100 garrapatas adultas (*Rhipicephalus sanguineus*) y se almacenaron inmediatamente en disolución helada RNeasy (Ambion) hasta su uso posterior. El ARN total se extrajo usando el método TRIzol™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La biblioteca de ADNc se construyó en el vector fagémido λTriPLEX2 usando el kit de construcción de bibliotecas de ADNc SMART (Clontech). Los ADNc se fraccionaron por tamaño con una columna ChromaSpin 400 (Clontech) según las instrucciones del fabricante antes de la ligación en el vector. El tamaño de los insertos de ADNc clonados en la biblioteca varió de aproximadamente 0,6 kb a 1,5 kb y la frecuencia de los insertos fue aproximadamente 80%.

45 Los insertos de ADNc de la biblioteca de ADNc de la glándula salivar de *Rhipicephalus sanguineus* en pTriPLEX2 se escindió con la enzima de restricción SfiI y se subclonó en el vector de expresión de células de mamíferos pEXP-lib (Clontech). El vector pEXP-Lib contiene un casete de expresión que comprende el promotor/amplificador inmediato temprano principal de citomegalovirus (CMV) humano seguido de un sitio de clonación múltiple; un sitio de entrada de ribosomas interno (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (ECMV); un gen que codifica resistencia a puomicina (puomicin-N-acetil-transferasa); y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El sitio de clonación múltiple contiene dos sitios distintos Sfi I (Sfi IA y Sfi IB, que se diferencian en sus secuencias interpalindrómicas), que permite la subclonación direccional de los insertos de ADNc del vector pTriPLEX2 en pEXPIL.

La proteína control vCCI (NCBI No. Reg. CAC05575; SEQ ID NO: 1) se expresó por clonación del ADNc que codifica la proteína (NCBI No. Reg. AJ277111; SEQ ID NO: 2) en pEXP-lib como se ha descrito anteriormente para generar pEXP-lib vCCI.

c. Cribado de la biblioteca usando sobrenadantes de células HEK293

- 5 Se mantuvieron células de riñón embrionario humano 293 (células HEK293; ATCC No. Cat. CRC-1573) en DMEM-F12 Nut Mix, 10% suero de ternera fetal inactivado con calor, 2 mM L-Glutamina, 100 unidades/ml de disolución de penicilina-estreptomicina.

Los plásmidos pEXP-lib que expresan la biblioteca de ADNc de *Rhipicephalus sanguineus* se agruparon en grupos que se transfectaron en células HEK293 usando un kit de transfección GenePorter2 (Gene Therapy Systems) según el protocolo del fabricante. El plásmido pEXP-lib que expresa la proteína control vCCI se transfectó en HEK293 de la misma manera.

El medio de cultivo de las células HEK293 transfectadas se recogió de las células crecidas en medio completo después de tres días de cultivo. El medio condicionado se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se usó en un ensayo de entrecruzamiento.

- 15 Para los ensayos de entrecruzamiento, las muestras de medio condicionado se transfirieron a una placa de 96 pocillos (Costar). Se añadió una quimioquina CC radiomarcada (^{125} I-CXCL8/IL-8) a una concentración final de 0,23 nM a 50 μ l de cada muestra de sobrenadante y se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se transfirió una alícuota de 25 μ l de cada pocillo a un nuevo pocillo que contenía 5 μ l de 25 mM BS3 (reactivo de entrecruzamiento) y se incubó más durante 1 hora con agitación. Después de este tiempo, se añadieron 5 μ l de 10X tampón de muestra (125 mM Tris base, pH 6,8, que contenía 10% SDS, 5 mM EDTA, 20% glicerol, 0,2% p/p de azul de bromofenol, 1 M DTT) a cada pocillo para parar la reacción de entrecruzamiento. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis en un gel de Bis-Tris SDS-poliacrilamida 10% (Invitrogen NuPAGE, no. de catálogo NP0301BOX). Después de la electroforesis, el gel se selló en envoltura Saran™ y se expuso a una pantalla de almacenamiento de phosphorimager tipo K (Biorad) durante 3 a 16 horas. Las pantallas de imagen se escanearon a una resolución de 100 μ m usando un phosphorimager Biorad Personal FX.

Resultados

- 30 Se ha mostrado que la saliva de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* contiene actividades inmunomoduladoras, tales como supresión de la producción de IgG y de citoquinas (Matsumoto K et al., 2003) o la proliferación de las células T (Ferreira BR y Silva JS, 1998) pero no actividades dirigidas específicamente a quimioquinas CC o CXC. Sin embargo, la actividad de unión a quimioquinas se ha detectado en la saliva de otras especies de garrapata (Hajnicka et al., 2005).

Con el fin de detectar una actividad de unión a quimioquinas CXC en *Rhipicephalus sanguineus* a nivel de secuencia de ADN/proteína se generó una biblioteca de ADNc de las glándulas salivares de *Rhipicephalus sanguineus*. Los grupos de los ADNc de esta biblioteca se usaron para transfectar células de mamífero (HEK293).

- 35 En este sistema, los ADNc que codifican proteínas secretadas se expresan por las células HEK293 y se secretan en el medio de cultivo. Los sobrenadantes pueden ensayarse directamente, en un ensayo de entrecruzamiento usando una quimioquina CXC radiomarcada (^{125} I-CXCL8/IL-8). La adición del reactivo de entrecruzamiento a la quimioquina CXC radiomarcada/proteína de unión a quimioquina CXC estabiliza el complejo proteico por unión de las dos moléculas covalentemente. El complejo resultante puede identificarse por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior autorradiografía como un desplazamiento de la banda del peso molecular de la quimioquina nativa al peso molecular del complejo. Este método de entrecruzamiento es altamente sensible ya que pueden detectarse cantidades de nanogramo de proteína.

- 45 Como control positivo, el medio condicionado de las células HEK transfectadas con vCCI se ensayó en paralelo. Como control negativo, se usó el medio condicionado de células HEK293 transfectadas en falso. Los grupos de ADNc que proporcionaron una señal positiva en el ensayo de entrecruzamiento se sometieron a ciclos sucesivos de cribado y deconvolución hasta que pudo identificarse un único ADNc transfectado como responsable de la actividad de unión a quimioquinas CXC. El ADNc resultante se denominó Evasina-3 (Fig. 1).

- 50 El ADNc que codifica Evasina-3 (SEQ ID NO: 3) contiene un Marco de Lectura Abierto (ORF; SEQ ID NO: 4) que codifica una proteína de 92 aminoácidos (SEQ ID NO: 5). Se predice que la secuencia de la proteína contiene una secuencia de péptido señal (residuos 1-26), que cuando se escinde genera una proteína madura de 66 aminoácidos (SEQ ID NO: 6). La Evasina-3 no tiene una homología significativa con ninguna proteína conocida.

Las características adicionales de la Evasina-3 son 2 sitios potenciales de glicosilación (en Asparagina 51 y 82, según la numeración de la proteína completa) y una serie de Cisteínas que pueden emparejarse para formar puentes disulfuro (residuos 48, 52, 59, 63, 65 y 76, según la numeración de la proteína completa).

Ejemplo 2: Purificación y caracterización de la Evasina-3 expresada en sobrenadante del cultivo de células HEK293 EBNA como una proteína recombinante etiquetada con 6His

Materiales y métodos

a. Suclonación del ADNc de Evasina-3 en los vectores de expresión pDEST8 y pEAK12d usando el proceso de clonación Gateway™

La primera etapa del proceso de clonación Gateway implica una reacción de PCR de dos etapas (PCR1 y PCR2) que genera el ORF de la Evasina-3 flanqueado en el extremo 5' por un sitio de recombinación attB1 y secuencia Kozak y flanqueado en el extremo 3' por una secuencia que codifica una etiqueta de 6 Histidinas (6His) en marco, un codón de parada y el sitio de recombinación attB2 (ADNc compatible con Gateway; Fig. 2). La reacción de PCR 1 (en un volumen final de 50 µl) contiene: 2 µl (50 ng) de pEXP-Lib-Evasina-3, 3 µl dNTP (5 mM), 5 µl de 10X tampón de polimerasa Pfx, 1 µl MgSO₄ (50 mM), 1,5 µl de cada cebador específico de gen (10 µM) (evasina3 PCR1F (SEQ ID NO: 7) y evasina3 PCR1R; SEQ ID NO: 8) y 0,5 µl de ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). La 1ª reacción de PCR se realizó usando una etapa inicial de desnaturalización de 95°C durante 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 94°C durante 30 s; 48°C durante 30 s y 68°C durante 1 min 30 s; y un ciclo de espera de 4°C. Los productos de la amplificación se purificaron directamente usando el Kit de Purificación de PCR QIAquick (QIAGEN). El producto de PCR se eluyó en 50 µl de tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) según las instrucciones del fabricante.

La segunda reacción de PCR (en un volumen final de 50 µl) contenía 10 µl de producto de PCR1 purificado, 3 µl dNTP (5 mM), 10 µl de 10X tampón de polimerasa Pfx, 1 µl de MgSO₄ (50 mM), 1,5 µl de cada cebador de conversión Gateway (10 µM) (evasina3 PCR2F, SEQ ID NO: 9) y evasina3 PCR2 R; SEQ ID NO: 10) y 0,5 µl de ADN polimerasa Pfx Platinum. Las condiciones para la segunda reacción de PCR fueron: 95°C durante 1 min; 4 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos y 68°C durante 2 min; 20 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min; y un ciclo de espera a 4°C. Los productos de PCR resultantes se visualizaron en un gel de agarosa 1,5% en 1 X tampón TAE (Invitrogen) y se purificó una banda que migraba a la masa molecular predicha (430 pb) del gel usando el Kit de Extracción del Gel QIAquick (QIAGEN) y se eluyó en 50 µl Tampón EB según las instrucciones del fabricante.

La segunda etapa del proceso de clonación Gateway implica la subclonación del producto de PCR modificado Gateway en el vector de entrada Gateway pDONR221. Cinco µl del producto PCR2 purificado se incubaron con 1,5 µl del vector pDONR221 (0,1 µg/µl), 2 µl de tampón BP y 1,5 µl de mezcla de enzimas clonasa BP (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se paró por adición de 1 µl de proteinasa K (2 µg/µl) y se incubó a 37°C durante 10 min más. Una alícuota de esta reacción (1 µl) se usó para transformar células *E. coli* DH10B por electroporación como sigue: una alícuota de 20 µl de células DH10B electrocompetentes (Invitrogen) se descongeló en hielo y se añadió 1 µl de la mezcla de reacción BP. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación helada de 0,1 cm y las células se electroporaron usando un Gen-Pulser™ de BioRad según el protocolo del fabricante. Se añadió medio SOC (1 ml) que se había precalentado a temperatura ambiente inmediatamente después de la electroporación. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó, con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 µl y 100 µl) se sembraron en placas en placas de caldo L (LB) que contenían kanamicina (40 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se preparó ADN de plásmido mini-prep a partir de cultivos de 5 ml de 4 de las colonias resistentes a kanamicina resultantes usando el sistema robótico Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen). El ADN plasmídico (200-500 ng) se sometió a secuenciación de ADN con los cebadores 21M13 y M13Rev usando el sistema BigDyeTerminator (Applied Biosystems no. de cat. 4336919) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron usando placas de lavado Montage SEQ 96 (Millipore no. de cat. LSKS09624) y se analizaron en un secuenciador de ADN 3700 de Applied Biosystems.

El eluato de plásmido (1,5 µl o aproximadamente 100 ng) de uno de los clones, que contenía la secuencia correcta (pDONR221_Evasina-3-HIS, Fig. 3A) se usó en reacciones de recombinación que contenían 1,5 µl del vector pDEST8 o del vector pEAK12d (0,1 µg/µl), 2 µl de tampón LR y 1,5 µl de clonasa LR (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las reacciones se pararon por adición de Proteinasa K (2 µg) y se incubaron a 37°C durante 10 minutos más. Una alícuota de cada reacción (1 µl) se usó para transformar células de *E. coli* DH10B por electroporación como sigue: una alícuota de 20 µl de células DH10B electrocompetentes (Invitrogen) se descongeló en hielo y se añadió 1 µl de la mezcla de reacción LR. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación helada de 0,1 cm y las células se electroporaron usando un Gen-Pulser™ de BioRad según el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadió medio SOC (1 ml) que se había precalentado a temperatura ambiente inmediatamente después de la electroporación. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó, con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 µl y 100 µl) se sembraron en placas en placas de caldo L (LB) que contenían ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se preparó ADN de plásmido mini-prep a partir de cultivos de 5 ml inoculados con 6 de las colonias resistentes a ampicilina resultantes subclonadas en cada vector usando un Robot 8000 Qiaprep Bio (Qiagen). El ADN plasmídico (200-500 ng) en el vector pEAK12d se sometió a secuenciación de ADN con los cebadores pEAK12F (SEQ ID NO: 11) y pEAK12R (SEQ ID NO: 12). De manera similar, el ADN plasmídico (200-500 ng) en el vector pDEST8 se sometió a secuenciación de ADN con los cebadores pDEST8F (SEQ ID NO: 13) y pDEST8R (SEQ ID NO: 14) como se ha descrito anteriormente.

El ADN plasmídico maxi-prep se preparó a partir de un cultivo de 500 ml de los clones con la secuencia verificada (pEAK12d_Evasina-3-HIS y pDEST8_Evasina-3-HIS) (Fig 3C y 3B, respectivamente) usando el Kit Qiagen Plásmido MEGA (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se resuspendió a una concentración de 1 µg/µl en agua estéril (ó 10 mM Tris-HCl pH 8,5) y se almacenó a -20°C.

Las secuencias de los cebadores usados en las diferentes etapas de sub/clonación se resumen en la Tabla III.

b. Inserción de una etiqueta 6His en el C terminal de la secuencia ORF del plásmido pEXP1I-evasina3 usando el Kit de Mutagénesis Dirigida a Sitio QuikChange II (Stratagene)

La primera etapa del proceso de mutagénesis dirigida a sitio implica una reacción de PCR que genera un plásmido mutado con el ORF de Evasina-3 flanqueado en el extremo 3' por una secuencia que codifica una etiqueta de 6 Histidinas (6His) en marco. La reacción de PCR (en un volumen final de 50 µl) contiene: 1 µl (50 ng) de plásmido pEXP-Lib-Evasina-3, 1 µl de mezcla de dNTP, 5 µl de 10X tampón de reacción, 2 µl de cada cebador específico de gen (62,5 µM) (evasina3-6HisF y evasina3-6HisR; SEQ ID NO: 19 y 20) y 1 µl de ADN polimerasa *Pfu Ultra* HF según las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se realizó usando una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 30 s, seguido de 18 ciclos de 95°C durante 30 s; 55°C durante 1 minuto y 68°C durante 5 min 30 s; y un ciclo de espera de 4°C.

La segunda etapa del proceso de mutagénesis dirigida a sitio implica el tratamiento del producto de PCR con la endonucleasa *Dpn1*, específica para ADN metilado y hemimetilado, para digerir el ADN plasmídico metilado parental y para seleccionar ADN recién sintetizado que contiene mutación. El producto de PCR se incubó con 1 µl de enzima de restricción *Dpn1* (10U/µl) a 37°C durante 1 hora, según las instrucciones del fabricante.

Una alícuota de la reacción de digestión de restricción con *Dpn1* (1 µl) se usó para transformar células de *E. coli* XL-1 blue por choque con calor como sigue: un alícuota de 50 µl de células XL-1blue competentes (Stratagene) se descongeló en hielo y se añadió 1 µl de la mezcla de reacción *Dpn 1*. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y las células se sometieron a choque con calor a 42°C durante 45 s. Después las células se transfirieron a un baño de hielo durante 2 min. Se añadió medio NZY (0,5 ml) que se había precalentado hasta 42°C. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó, con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (250 µl) se sembraron en placas de caldo L (LB) que contenían ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se preparó ADN de plásmido mini-prep a partir de cultivos de 5 ml de 4 de las colonias resultantes usando un sistema robótico Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen). El ADN plasmídico (200-500 ng) se sometió a secuenciación de ADN con un cebador T7 (SEQ ID NO: 16) usando el sistema BigDyeTerminator (Applied Biosystems no. de cat. 4336919) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron usando placas de lavado Montage SEQ 96 (Millipore no. de cat. LSKS09624) y se analizaron en un secuenciador de ADN 3700 de Applied Biosystems.

El ADN plasmídico maxi-prep se preparó a partir de un cultivo de 500 ml del clón con la secuencia verificada (pEXP1I_Evasina-3-HIS) (Fig. 3D) usando el Kit Qiagen Plásmido MEGA (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se resuspendió a una concentración de 1 µg/µl en agua estéril (ó 10 mM Tris-HCl pH 8,5) y se almacenó a -20°C.

Las secuencias de los cebadores usados en las diferentes etapas de sub/clonación se resumen en la Tabla III.

c. Purificación de Evasina-3-HIS recombinante expresada en células HEK293

450 ml ó 250 ml del sobrenadante del cultivo celular de células HEK293-EBNA se recogió 6 días después de la transfección con pEAK12d-Evasina-3-HIS o con pEXP1IEvasina-3-HIS y se diluyó con 2 volúmenes de 50 mM tampón de fosfato de sodio pH 7,5 que contiene 0,6 M NaCl y 8,7% (vol/vol) de glicerol. La muestra se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 µm, se cargó a 20 ml/min a 4°C en una columna de afinidad de quelatos de metal PORUS 20 MC de 4 ml (PerSeptive Biosystem) cargada con iones Ni²⁺ con una disolución de 100 mM Ni(II)SO₄ (Fluka, ref 72280) usando un sistema Vision Workstation (PerSeptive Biosystem). El material unido no específicamente se eliminó lavando la columna a 20 ml/min con 28 volúmenes de columna (CV) de 50 mM tampón de fosfato de sodio pH 7,5 que contenía 0,6 M NaCl, 8,7% glicerol (No. de Catálogo: 49781; Fluka) y 20 mM imidazol (Fluka, ref 56749). La columna se eluyó en fracciones de 2,7 ml con 5,5 CV de 50 mM tampón de fosfato de sodio pH 7,5 que contenía 0,6 M NaCl, 8,7% glicerol y 400 mM imidazol (No. de Catálogo: 56749; Fluka) a 2,0 ml/min. El

pico de proteína eluido se desaló por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Sefadex G-25 de 20 ml (Pharmacia) eluida en fracciones de 2,7 ml con 1 CV de PBS que contenía 20% de glicerol.

Las fracciones que contenían Evasina-3-HIS se juntaron y se dializaron frente a 5 litros de 50 mM bicarbonato de amonio pH 8,0 durante 16 h y se liofilizaron usando un liofilizador móvil 12EL (Virtis) y se resuspendieron en 100 µl de agua estéril. El grupo concentrado se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño como segunda etapa de purificación. En una columna SX200 10/300 GL (volumen de lecho de 25 ml; No. de catálogo: 17-5175-01; Amersham Biosciences) que se equilibró en primer lugar en 50 mM bicarbonato de amonio, se inyectaron 200 µl de la Evasina-3-HIS diluida con 1 volumen de 50 mM bicarbonato de amonio. La proteína se eluyó en fracciones de 0,5 ml cada una a 2,5 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína Evasina-3-HIS se juntaron, se liofilizaron, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C.

d. Análisis de transferencia Western, SDS-PAGE, entrecruzamiento y cromatografía de exclusión por tamaño de Evasina-3-HIS recombinante

Para los análisis por transferencia Western los eluatos de la columna se diluyeron 1:3 con 3x ampón de muestra (Azul de bromofenol con 125 mM Tris-HCl pH 6,8 que contenía 20% Glicerol, 10% SDS, 5 mM EDTA y 100 mM DTT) y se hirvieron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras y un estándar de peso molecular etiquetado con HIS (No. de Catálogo: LC5606; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris 10% que se corrió en tampón MES a 200 V durante 35 min. Las proteínas sometidas a electroforesis se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (No. de Catálogo: LC2001; Invitrogen) en tampón de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris base y 20% metanol, pH 8,3) durante 1 hora a temperatura ambiente, usando una corriente constante de 290 mA. La membrana se bloqueó incubando en 20 ml de disolución de bloqueo (0,1% Tween 20, 5% leche en polvo en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma giratoria. La membrana se incubó en 15 ml de la disolución que contenía el anticuerpo primario anti-etiqueta de histidina (diluido 1:1.000 en 0,1% Tween 20, 2,5% leche en polvo en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Los anticuerpos primarios usados fueron His-sonda H-15 (sc-803; Santa Cruz Biotechnology) o His-sonda G-18 (sc-804; Santa Cruz Biotechnology). La membrana se lavó con tampón de lavado (0,1% Tween 20 en PBS) y se lavó con 3 cambios de tampón de lavado (10 minutos cada uno). La membrana se incubó en anticuerpo secundario conjugado con HRP (diluido 1:3.000 en PBS con 0,1% Tween 20, 2,5% leche en polvo) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lavó de nuevo como se ha descrito previamente. Finalmente, la membrana se secó y la tinción del anticuerpo se visualizó usando el kit de Detección de Reactivos de Transferencia Western ECL™ (no. de Catálogo: RPN2106; Amersham Pharmacia), según las instrucciones del fabricante.

Para el análisis por SDS-PAGE, los eluatos de la columna se diluyeron 1:1 con 2x tampón de muestra (Invitrogen) que contenía 100 mM DTT y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras y un estándar de peso molecular (Benchmark Protein Ladder; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris 10% que se corrió en tampón MES a 200 V durante 35 min. Las proteínas sometidas a electroforesis se tiñeron usando Simply Blue SafeStain (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante: el gel se lavó tres veces con agua destilada durante 5 min, se tiñó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con agua durante 1 hora.

Para los experimentos de entrecruzamiento, las células HEK293 se transfectaron con pEAK12d-Evasina-3-6His. Después de 6 días, 50 µl del sobrenadante del cultivo se transfirieron a una placa de 96 pocillos (Costar). Se añadió bien una ¹²⁵I-quimioquina-CC (¹²⁵I-CCL5/RANTES, ¹²⁵I-CCL11/eotaxina, CCL2/¹²⁵I-MCP-1, ¹²⁵I-CCL17/TARC o ¹²⁵I-CCL27/CTACK) una ¹²⁵I-quimioquina-CXC (¹²⁵I-CXCL8/IL-8, ¹²⁵I-CXCL1/Gro-alfa o ¹²⁵I-CXCL19/IP-10) o una citoquina (¹²⁵I-IL-1 o ¹²⁵I-IL-2) a una concentración final de 0,23 nM y se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Una alícuota de 25 µl de cada pocillo se transfirió a un nuevo pocillo que contenía 5 µl de 25 mM BS3 (reactivo de entrecruzamiento) y se incubó más durante 1 hora con agitación y la reacción se paró por la adición de 5 µl de 10X tampón de muestra (125 mM Tris base, pH 6,8, que contenía 10% SDS, 5 mM EDTA, 20% glicerol, 0,2% p/p azul de bromofenol, 1 M DTT). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida Bis-Tris SDS 10% (Invitrogen NuPAGE, no. de catálogo NP0301BOX). Después de la electroforesis el gel se selló en envoltura Saran™ y se expuso a una pantalla de almacenamiento de phosphorimager de tipo K (Biorad) durante 3 a 16 horas. Las pantallas de imagen se escanearon a una resolución de 100 µm usando un phosphorimager Personal FX de Biorad.

Para el ensayo de competición, se usó el mismo protocolo que para el experimento de entrecruzamiento descrito anteriormente usando ¹²⁵I-CXCL8/IL-8 con la adición de un exceso de 500 veces de CXCL8/IL-8 o CXCL1/Gro-alfa sin marcar.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó con Evasina-3-6His recombinante y CXCL8/IL-8 suspendida a 1 mg/ml en PBS. Se mezclaron 100 µg (100 µl) de Evasina-3-6His en una proporción 1:1 con 100 µg (100 µl) de CXCL8/IL-8 y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo: Evasina-3-6His-CXCL8/IL-8. Después, se aplicaron 200 µg (200 µl) de CXCL8/IL-8, 200 µg (200 µl) de Evasina-3-6His recombinante ó 200 µg (200 µl) del complejo a una columna Superdex 75 10/300 GL (volumen 23,56 ml, Invitrogen) previamente equilibrada en 1xPBS sobre 1,5 CV. la columna se calibró previamente con azul de dextrano (2.000 kDa), tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), BSA (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), ribonucleasa A (13,7

kDa) y citocromo C (13,6 kDa). La columna se eluyó sobre 1,5 CV con 1xPBS y las fracciones correspondientes al pico se analizaron por SDS-PAGE con tinción de plata. Para el análisis por SDS-PAGE, las muestras se diluyeron 3:1 con 4x tampón de muestra (Invitrogen) que contenía 100 mM DTT y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras y un estándar de peso molecular (Benchmark Protein Ladder; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris 10% que se corrió en tampón MES a 200 V durante 35 min. Las proteínas sometidas a electroforesis se tiñeron usando el kit SiverQuest (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El gel se fijó con una disolución de 40% etanol y 10% ácido acético, se lavó con una disolución de 30% etanol, se sensibilizó con una disolución de 30% etanol y 10% de sensibilizador, se lavó dos veces con agua y se tiñó con una disolución de 1% de tinción, se lavó con agua, se reveló con una disolución de 10% de revelador y se paró con la adición de 10% de parada.

Resultados

Con el fin de producir evasina 3 recombinante, el ORF se subclonó con o sin una secuencia de etiqueta 6HIS en el extremo 3' del ORF en el vector de expresión de células de mamífero pEAK12d o el vector de expresión en células de insecto (pDEST12.2) usando el sistema de clonación Gateway. Además, la construcción original pEXP_lib_evasina_3 se mutó por mutagénesis dirigida a sitio para introducir una secuencia de etiqueta 6HIS en el extremo 3' del ORF para la expresión en células HEK293. La Evasina-3-HIS recombinante se purificó de sobrenadantes de células HEK293 EBNA transfectadas con pEAK12d-Evasina-3-6His o sobrenadantes de células HEK293 EBNA transfectadas con pEXP11-Evasina-3-6His usando cromatografía de afinidad con Ni²⁺ seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. La tinción con azul de Coomassie de un gel de SDS-PAGE en el que se había cargado la proteína purificada sugiere que la Evasina-3-6HIS se expresó y purificó como una mezcla de diferentes formas modificadas después de la traducción, posiblemente por glicosilación como se muestra para otra proteína de garrapata expresada en células de insecto (Alarcon-Chaidez FJ et al., 2003). De hecho, la proteína aparece como una banda difusa, con un peso molecular medio de aproximadamente 20-30 Kd para la proteína recombinante expresada en HEK293 (Fig. 4).

La presencia de la Evasina-3-6HIS recombinante durante las diferentes etapas de purificación de HEK293 se siguió por transferencia Western con anti-etiqueta histidina como anticuerpos primarios. El N terminal de la secuencia purificada, madura se ha secuenciado, confirmando que la secuencia LVSTIESRTS forma el extremo N terminal del 80% de la proteína madura con glicosilación en los residuos S y T y que la secuencia VSTIESRTSA forma el extremo N terminal del 20% de la proteína madura sin la presencia de glicosilación.

La actividad de unión a quimioquinas CXC de la Evasina-3-6HIS purificada se comparó con la actividad observada usando el control positivo (la proteína de unión a quimioquinas CC viral vCCI) usando el ensayo de entrecruzamiento usado inicialmente para caracterizar la actividad en la saliva de garrapata de *Rhipicephalus sanguineus*.

En el análisis por SDS-PAGE, la quimioquina CXC libre CXCL8/IL-8 marcada con ¹²⁵I migra como una banda de 8 kDa (Fig. 4, Carril 2). Cuando se añade el agente de entrecruzamiento, una parte de la radiactividad se retiene en un complejo proteico que tiene un peso molecular de 28-40 kDa, en la muestra que contiene Evasina-3 recombinante (Fig. 4, Carril 3). La banda correspondiente al complejo formado entre la proteína vCCI y ¹²⁵I-CCL2/MCP-1 usado como control para el experimento de entrecruzamiento migra aproximadamente a 45 kDa (Fig. 4, Carril 1). Dado que el peso molecular del polipéptido Evasina-3 maduro (66 aminoácidos) es 7.005 Da, la proteína recombinante parece ser activa cuando se expresa en células huésped eucariotas cuando se modifica después de la traducción. Estas modificaciones pueden ser responsables de hasta 20-30 kDa (como sugiere también la tinción con azul de Coomassie en la Fig. 6) y son debidas probablemente a glicosilación alternativa.

La selectividad de la Evasina-3 recombinante se ensayó en primer lugar en un ensayo de competición para entrecruzamiento con ¹²⁵I-CXCL8/IL-8. Tanto CXCL8/IL-8 como CXCL1/Gro-alfa sin marcar causaron la desaparición del complejo radiomarcado (Fig. 5, indicado con flechas), confirmando de esta manera la unión de Evasina-3 recombinante a CXCL1/Gro-alfa. Ninguna de las demás quimioquinas ensayadas causó la desaparición del complejo radiomarcado (Fig. 5).

La selectividad se ensayó adicionalmente usando Evasina-1 recombinante purificada en un ensayo de entrecruzamiento usando diferentes ¹²⁵I-quimioquinas-CC, quimioquinas CXC y citoquinas (Fig. 7). Como para el entrecruzamiento descrito anteriormente, una banda entre 28-40 kDa (indicada con una flecha) correspondiente al complejo es visible cuando se añade ¹²⁵I-CXCL8/IL-8 (Fig. 7, carril 7). Una banda con una intensidad menor (indicada con una flecha que migra) en el mismo tamaño también es visible cuando se entrecruza con ¹²⁵I-CXCL1/Gro-alfa, lo que indica que la Evasina-3 recombinante también es capaz de formar un complejo con esta quimioquina CXC (Fig. 7, carril 2). En el caso de otras ¹²⁵I-proteínas ensayadas, no es visible la formación de ningún complejo en el gel. De nuevo, vCCI incubado con ¹²⁵I-MCP-1 se usó como control positivo (Fig. 7, carril 1, indicado con una flecha).

Por lo tanto, puede concluirse que la Evasina-3 es una nueva proteína que tiene propiedades de unión a quimioquinas CXC, inhibiendo de esta manera la acción de la quimioquinas.

Ejemplo 3: Purificación y validación de la Evasina-3 expresada en *Escherichia coli*.Materiales y métodos*a. Subclonación del ADNc de Evasina-3 en el vector de expresión pET30a.*

La primera etapa del proceso de clonación implica una reacción de PCR, que genera el ORF de la Evasina-3 menos el péptido señal, y flanqueado en el extremo 5' por una metionina de inicio y un sitio de restricción NdeI y flanqueado en el extremo 3' por dos codones de parada (TAA TAA) y el sitio de restricción XhoI (Fig. 8). La reacción de PCR (en un volumen final de 50 µl) contiene: 1 µl (100 ng) de plásmido pEXP-Lib-Evasina-3, 3,0 µl dNTP (5 mM), 10 µl de 10X tampón de polimerasa Pfx, 1 µl MgSO₄ (50 mM), 1,5 µl de cada cebador específico de gen (10 µM) (5'NdeI-eva3_ecoli SEQ ID NO: 21; 3'XhoI-eva3_ecoli SEQ ID NO: 22) (tabla IV), y 0,5 µl ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó usando una etapa inicial de desnaturalización de 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C durante 30 s; 55°C durante 30 s y 68°C durante 1 min; y un ciclo de espera de 4°C. El producto de PCR resultante se visualizó en un gel de agarosa 1,5% en tampón 1 X TAE (Invitrogen) y la banda que migraba a la masa molecular predicha (321 pb) se purificó del gel usando el Sistema de Purificación de ADN Preps PCR Wizard (Promega) y se eluyó en 50 µl de agua estéril según las instrucciones del fabricante.

La segunda etapa del proceso de clonación implica la digestión del producto de PCR modificado usando las enzimas de restricción NdeI y XhoI seguido de ligación en el vector pET30a. Cinco µl del producto de PCR purificado se incubaron con 1,0 µl de NdeI (50.000 u/ml, BioLabs), 1 µl de XhoI (50.000 u/ml, BioLabs), 6 µl de 100x tampón NED2 (BioLabs) y 0,6 µl de 100x BSA (BioLabs) en un volumen final de 60 µl a 37°C durante 16 horas. La mezcla de reacción se visualizó en un gel de agarosa 1,5% que se corrió en tampón 1 x TAE (Invitrogen) y la banda que migraba a la masa molecular predicha (320 pb) se purificó del gel usando el Sistema de Purificación de ADN Preps PCR Wizard (Promega) y se eluyó en 50 µl de agua estéril según las instrucciones del fabricante. El inserto purificado se ligó en el vector pET30a que se había desfosforilado previamente y digerido con las enzimas de restricción NdeI y XhoI como sigue: 15 µl de producto purificado de la digestión se incubaron con 3 µl del vector pET30a (150 ng), 1 µl de ligasa T4 (400.000 u/ml, BioLabs) y 2,2 µl tampón T4 10x (BioLabs) en un volumen final de 22 µl a temperatura ambiente durante 4 horas.

Una alícuota de esta reacción (1 µl) se usó para transformar células de *E. coli* DH10B por electroporación como sigue: una alícuota de 25 µl de células DH10B electrocompetentes (Invitrogen) se descongeló en hielo y se añadió 1 µl de la mezcla de reacción BP. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación helada de 0,1 cm y las células se electroporaron usando un Gen-Pulser™ de BioRad según el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadió medio SOC (0,5 ml) que se había precalentado a temperatura ambiente inmediatamente después de la electroporación. La mezcla se transfirió a un tubo con tapa a presión de 15 ml y se incubó, con agitación (220 rpm) durante 1 hora a 37°C. Las alícuotas de la mezcla de transformación (10 µl y 50 µl) se sembraron en placas en placas de caldo L (LB) que contenían kanamicina (40 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se preparó ADN de plásmido mini-prep a partir de cultivos de 5 ml de 6 de las colonias resultantes usando un sistema robótico Qiaprep Turbo 9600 (Qiagen). El ADN plasmídico (150-200 ng) se sometió a secuenciación de ADN con los cebadores T7 (SEQ ID NO: 23) y pRSET-R (SEQ ID NO: 24) (tabla IV) usando el sistema BigDye Terminator (Applied Biosystems no. de cat. 4336919) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron usando placas de lavado Montage SEQ 96 (Millipore no. de cat. LSKS09624) y se analizaron en un secuenciador 3700 de Applied Biosystems.

El ADN plasmídico (1 µl ó 100 ng) de uno de los clones, que contenía la secuencia correcta (pET30a-Evasina-3) se usó para transformar células de *E. coli* BL21D3 por choque con calor como sigue: una alícuota de 20 µl de células BL21DE3 (Novagen) se descongeló en hielo en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se añadió 1 µl del plásmido y la mezcla se incubó 5 min en hielo. Las células se sometieron a choque con calor 30 seg en un baño de agua a 42°C y se pusieron en hielo durante 2 min. Después de la adición de 80 µl de medio SOC a temperatura ambiente, las células se incubaron a 37°C durante 1 hora con agitación y alícuotas de la mezcla de transformación (20 µl y 80 µl) se sembraron en placas en placas de caldo L (LB) que contenían kanamicina (40 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Una colonia resistente a kanamicina se eligió para la expresión de Evasina-3. La verificación de la expresión de la proteína en la cepa de *E.coli* transformada se ensayó inoculando una única colonia resistente a kanamicina en un matraz erlenmeyer que contenía 50 ml de caldo de Luria-Bertani (LB), 40 µg/ml kanamicina. Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0,6 unidades, se añadieron 0,5 mM IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido) y se incubó durante 3 h más. El clón que proporcionó el mejor nivel de expresión después de la inducción con IPTG se usó para generar un cultivo de 100 ml que se inoculó en primer lugar en un fermentador de 5 L con medio a pH 7 que contenía glicerol como la fuente de carbono, sulfato de amonio como la fuente de nitrógeno, extracto de levadura, fosfato, sales, oligoelementos, antiespumante y 40 µg/l de kanamicina y se fermentó a 37°C. Se mantuvo el CO₂ al 30% con una velocidad de flujo de aire constante de 2,5 l/min y velocidad de flujo de O₂ que varió entre 0-5 L/min y una velocidad de agitación de 1.000-2.000 rpm. La expresión de la proteína se indujo a una DO de 20-30 con 1 mM IPTG. Las células se recogieron 3 h después de la inducción a una DO de 30-40. El peso húmedo de las células obtenido fue 200-300 g correspondiente a un peso seco de células de 10-20 g/L.

b. Purificación de Evasina-3 recombinante expresada en E. coli.

El sedimento de células de *E. coli* (250 g) se recogió 3 horas después de la inducción con IPTG de una fermentación de 5 L. El sedimento se suspendió en 1,25 L de tampón de ruptura de células (50 mM Tris-HCl pH 8,5, que contenía 2 mM MgCl₂, mezcla completa de inhibidores de proteasa sin EDTA (1 pastilla/50 ml de tampón, Roche) y 20 mg/l de ADNasa). Las células se rompieron mediante un paso a través de una Prensa de French (Sistema de Disrupción Celular Constante) a 1,7 kPa y la disolución se centrifugó durante 2 horas a 27.500 x g (13.000 rpm).

El pH de la fracción citosólica soluble se ajustó a pH 4,5 usando ácido acético y se centrifugó a 100.000 x g (35.000 rpm) durante 1 hora. Después de filtrar a través de un filtro de membrana de 0,22 µm, la proteína en el sobrenadante se cuantificó usando un ensayo colorimétrico con Reactivo de Ensayo de Proteínas Plus Coomassie (PIERCE) usando albúmina como un estándar y un lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices) para obtener la DO a 780 nm. El sobrenadante se cargó a 3,5 ml/min a 4°C en una columna de intercambio catiónico de Fractogel SO₃⁻ (Amersham) equilibrada previamente en 50 mM CH₃COONa pH 4,5 usando un sistema purificador Äkta (Amersham Bioscience). El material unido no específicamente se eliminó lavando la columna a 5 ml/min con 5 volúmenes de columna (CV) en 50 mM CH₃COONa pH 4,5. La proteína se eluyó en fracciones de 5 ml usando un gradiente lineal de 0-0,7 M NaCl en el mismo tampón con 17,5 volúmenes de columna (CV).

Las fracciones que contienen Evasina-3 se juntaron y se concentraron 10 veces usando dispositivos de filtro de centrifuga con un punto de corte de 3,5 kDa (Amicon, Millipore). El grupo concentrado se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño como la segunda etapa de la purificación. 2 ml de la disolución concentrada de Evasina-3 se cargaron en una columna SX75 16/60 (volumen de lecho de 120 ml; Amersham Biosciences), equilibrada previamente en PBS (Disolución Salina Tamponada con Fosfato). La proteína se eluyó en fracciones de 2 ml a 2 ml/min. Las fracciones que contenían Evasina-3 se juntaron, se alícuotaron y se almacenaron a -80°C.

d. Análisis por SDS-PAGE y entrecruzamiento de la Evasina-3 recombinante

Los eluatos de la columna se diluyeron 1:1 con 2x tampón de muestra (Invitrogen) que contenían 100 mM DTT y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras y un estándar de peso molecular (Benchmark Protein Ladder; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris 10% que se corrió en tampón MES a 200 V durante 35 min. Las proteínas sometidas a electroforesis se tiñeron usando Simply Blue SafeStain (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante: el gel se lavó tres veces con agua destilada durante 5 min, se tiñó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con agua durante 1 hora.

Resultados

El ORF que codifica la Evasina-3 se subclonó en un vector de expresión que permite un alto nivel de producción en *Escherichia coli*.

El plásmido que contiene el ADNc de longitud completa de Evasina-3 (pEXP-Lib_Evasina-3) se usó como molde de PCR para generar un ORF de Evasina-3 que consiste en la secuencia codificadora de la proteína madura de la Evasina-3 (después de la eliminación de la secuencia predicha del péptido señal) pero que retiene una metionina de inicio en el extremo N terminal. El ORF para Met-Evasina-3 (SEQ ID NO: 25) codifica una secuencia de 67 aminoácidos (SEQ ID NO: 26). El vector pET30a-Evasina-3 se proporciona en la Fig. 9.

La Evasina-3 recombinante se purificó de *E. coli*. La presencia de Evasina-3 recombinante durante las diferentes etapas de la purificación se siguió por SDS-PAGE usando geles teñidos con SimplyBlue SafeStain. La Evasina-3 migró con una masa molecular de 7 kDa como se confirmó por tinción de Coomassie después de SDS-PAGE (Fig. 10).

En el análisis por SDS-PAGE, la quimiocina CXC CXCL8/IL-8 marcada con ¹²⁵I migra como una banda de 8 kDa. Cuando se añade el agente de entrecruzamiento BS3, una parte de la radiactividad se detecta en un complejo proteico que migra a 14 kDa, que se debe a un complejo formado entre la Evasina-3 recombinante e IL-8 (Fig. 11).

Como las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* generalmente no están glicosiladas, es probable que la glicosilación posterior a la traducción de Evasina-3 no sea necesaria para la unión a IL-8.

El análisis de la proteína recombinante por espectrometría de masas por MALDI-TOF identificó un amasa de 7.131,42 Da, que corresponde a la masa predicha de la proteína recombinante incluyendo la metionina de inicio. La actividad no parece verse afectada por la presencia de la metionina de inicio.

Ejemplo 4: Caracterización de la actividad inhibidora de Evasina-3-6His y Evasina-3 recombinante sobre quimioquinas CXCMateriales y métodos*Ensayo de unión al receptor.*

5 Se usó un ensayo de unión a receptor competitivo en equilibrio para determinar las propiedades inhibidoras de Evasina-3 en la interacción quimioquina/receptor de quimioquina. Los experimentos de unión se realizaron usando células CHO (células de Ovario de Hámster Chino) que expresan de manera estable el receptor de IL-8 humano CXCR1 (CHO/CXCR1). Las células se mantuvieron en medio D-MEM F12 (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco, Invitrogen no. de catálogo: 41965039) suplementado con 10% FCS (Suero de Ternera Fetal; TerraCell, no. de catálogo: CS-C08-1000-A), 2 mM L-glutamina (Invitrogen no. de catálogo: 25030-024), 0,6 mg/ml Geneticina (Invitrogen no. de catálogo: 11811-031) y 1% penicilina-estreptomicina ((Invitrogen no. de catálogo: 15140-148). Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 230 x g, y se resuspendieron a una densidad celular de 4 x 10⁶ células/ml en tampón 50 mM Tris/HCl pH 7,5 que contenía 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ y 0,5% BSA. La Evasina-3-6His o Evasina-3 recombinante purificada de células HEK 293 o *E. coli*, respectivamente, se suspendió a 0,01 mg/ml en el mismo medio y se prepararon once diluciones seriada de 4 veces en un sistema de filtración de 96 pocillos MultiScreen HTS (Millipore). Las células CHO/CXCR1 (1x10⁵ células), 0,1 nM [¹²⁵I]-IL8 (Amersham no. de catálogo: IM249) y 25 µl de las diluciones seriadas de Evasina-3-6His o Evasina-3 recombinante se pusieron en cada pocillo de la placa en un volumen final de 100 µl para conseguir un intervalo de concentración final de la proteína recombinante de 350 µM a 0,08 pM. La mezcla se incubó 4 h a temperatura ambiente con agitación. Las células se lavaron tres veces con tampón 50 mM Tris/HCl pH 7,5 que contenía 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,5% BSA y 2 M NaCl. Se añadió líquido de centelleo (50 µl) (Perkin Elmer) a cada pocillo y la radiactividad se midió usando un contador de centelleo β (Wallac). Véanse los Resultados y la Fig. 12.

b. Quimiotaxis inducida por quimioquinas CXC

25 Los experimentos de quimiotaxis se realizaron en neutrófilos purificados de sangre humana obtenida del Hospital de la Universidad de Génova. Los neutrófilos humanos expresan de forma natural CXCR1 y CXCR2. Los neutrófilos humanos se purificaron en el día del experimento como sigue: sangre de una capa leuco-plaquetaria humana se diluyó 2x con PBS estéril y se pusieron 50 ml en un tubo cónico de polipropileno. Se añadió dextrano 500 (Amersham Bioscience no. de catálogo: 17-0320-02) a la sangre (3 ml/20 ml de sangre) y se dejó que las células sanguíneas rojas sedimentaran durante 1 h a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó en un tubo fresco y se centrifugó durante 5 min a 230 x g. El sedimento celular se suspendió en 10 ml de medio RPMI 1640 (Invitrogen, no. de catálogo: 31870-025) suplementado con 2% FCS. Se pusieron cuidadosamente capas de Ficoll-Plaque (10 ml) en la disolución de células y se centrifugó a 345 x g a 4°C durante 30 min (sin freno). El sedimento celular se lavó una vez con medio RPMI y se destruyeron todas las células sanguíneas rojas por choque hipotónico por la adición de 10 ml de 0,2% NaCl durante 20 segundos. La isotonicidad se restauró rápidamente por la adición de 10 ml de disolución 1,6% NaCl. La suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 230 x g, el sobrenadante se desechó cuidadosamente y el sedimento celular se lavó dos veces con medio. Los neutrófilos purificados se suspendieron a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml en medio de quimiotaxis (medio RPMI 1640 sin indicador rojo de fenol (Invitrogen no. de catálogo: 32404-014), suplementado con 2% FCS).

40 La Evasina-3-6His se suspendió a 1,25 x 10⁻² mg/ml en medio de quimiotaxis y se prepararon once diluciones seriadas de 3 veces usando medio que contenía 1 nM CXCL8/IL-8 o CXCL1/Gro-alfa. Se añadieron alícuotas (32 µl) de la disolución de quimioquina diluida de manera seriada o de la disolución de quimioquina-Evasina-3-6His en triplicado a los compartimentos inferiores de una cámara de quimiotaxis y se puso cuidadosamente una unidad de filtro con un tamaño de poro de 8 µm (Neuroprobe ChemoTx System, no. de catálogo: 101-8) en la parte superior del compartimento inferior. La suspensión celular de neutrófilos (20 µl) se añadió al compartimento superior de la cámara de quimiotaxis (unidad del filtro) y el ensamblaje se incubó durante 2 horas a 37°C en un incubador humidificado con 5% CO₂.

50 Después de 2 h, se quitó cuidadosamente la tapa de la cámara de quimiotaxis y se desechó. Se puso una placa con embudo de 96 pocillos (Neuroprobe ChemoTx System, no. de catálogo: FP1) al revés en la parte superior del compartimento inferior de la cámara de quimiotaxis. Se puso una placa de matriz negra (Vitaris no. de catálogo: 3915) al revés en la parte superior de la placa con embudo y se dio la vuelta al ensamblaje cámara de quimiotaxis/placa con embudo/ placa de matriz negra. El medio en el compartimento inferior de la cámara de quimiotaxis se transfirió a la placa de matriz negra por centrifugación durante 2 minutos a 700 x g. La placa de matriz negra que contenía las células que habían migrado se selló y se almacenó congelada durante 2 horas a -80°C. El número de células que había migrado al compartimento inferior de la cámara de quimiotaxis se determinó indirectamente usando el kit del ensayo de proliferación celular CyQUANT (Molecular Probes no. de catálogo: C7026) como sigue: la placa negra se descongeló y las células se resuspendieron inmediatamente y completamente en 200 µl de tampón de lisis celular que contenía el agente de tinción proporcionado en el kit, según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió en un lector de placas Wallac Victor usando longitudes de onda de excitación/emisión de 480 nm/520 nm. Véanse los Resultados y la Fig. 13.

c. Análisis de unión por resonancia de plasmón superficial (SPR)

La Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) se usó para medir directamente la afinidad y la cinética de la unión de quimioquina CXC por Evasina-3-6His o Evasina-3. La Evasina-3-6His o Evasina-3 se suspendieron a 20 µg/ml en tampón 10 mM acetato de sodio pH 4,5 o pH 4 (Biacore) respectivamente y se inmovilizaron directamente en un chip CM4 (Biacore) por una química de acoplamiento de amina estándar con el kit de acoplamiento de Amina Biacore (Biacore) para alcanzar un nivel de 200-300 unidades de respuesta (RU) usando un sistema Biacore3000. Se preparó una célula blanco como un control con el acoplamiento químico sin proteína añadida. Los experimentos se realizaron a 25°C y 30 µl/min usando tampón de corrida HBS-P (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl y 0,005% tensioactivo P20) (Biacore). Para todos los experimentos de unión, las quimioquinas se suspendieron a 0,5 µg/ml en tampón de corrida y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. El tiempo de inyección fue 3 min seguido de un tiempo de disociación de 2,5 min después de la inyección. El chip se regeneró usando tampón 50 mM Glicina, pH 2 durante 30 s. Para cada experimento, las quimioquinas se inyectaron en triplicado en orden aleatorio. Para los experimentos de cinética, se prepararon 6 diluciones de CXCL1/Gro-alfa, CXCL8/IL-8, CXCL1/KC murina y CXCL2/MIP-2 murina de 0,1 µg/ml a 6 ng/ml en tampón de corrida, se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm y se inyectaron sobre las células de flujo experimentales y blanco. El tiempo de inyección fue 3 min seguido de un tiempo de disociación de 15 min y el chip se regeneró usando tampón 50 mM Glicina, pH 2 durante 30 s. De nuevo, cada dilución de quimioquina se inyectó en triplicado en un orden aleatorio.

Para el análisis, los sensogramas de la célula blanco, además de los sensogramas obtenidos con el tampón de corrida solo, se restaron de la unión para eliminar el ruido del sistema. Para la cinética, los valores de asociación (k_a) y de disociación (k_d) se determinaron simultáneamente por el ajuste global de los sensogramas para un intervalo entero de concentraciones de quimioquina según el modelo de ajuste de Langmuir. Las constantes de disociación en equilibrio aparentes (K_d) se determinaron a partir de los valores cinéticos medios con la ecuación: $K_d = k_d/k_a$. Véanse los Resultados y las Figuras 14, 15 y 16.

d Inhibición del reclutamiento de neutrófilos mediado por quimioquinas in vivo

Se proporcionó a ratones Evasina-3 a dosis que variaban de 0,01 a 100 µg/ratón o vehículo (disolución salina) por vía subcutánea (s.c.) 45 minutos antes de la administración de 30 ng de KC (CXCL1 murina) en la articulación de la rodilla derecha de ratones C57Bl6. Después de 4 horas, los ratones se sacrificaron y se contó el número total de leucocitos infiltrantes (los neutrófilos comprenden más del 95% de estas células) en una cámara de Neubauer. Los recuentos diferenciales se realizaron en portas citospin teñidos. Hubo 3-4 animales en cada grupo experimental. Véanse los Resultados y la Fig. 17.

Resultados

Las propiedades de unión a quimioquinas CXC de la Evasina-3-6His y de la Evasina-3 se estudiaron en un ensayo de unión a receptor, un ensayo de migración celular inducida por quimioquinas CXC y por Resonancia de Plasmón Superficial.

El ensayo de unión a receptor demostró que la Evasina-3 expresada en células de mamífero (células HEK293) como una proteína etiquetada con 6His o en un sistema de expresión procariota (E. coli) fue capaz de inhibir la unión de IL-8 yodada a su receptor CXCR1, con valores de CI_{50} de 1 y 20 nM, respectivamente (Fig. 12).

La Evasina-3 (Evasina-3-6His producida en células HEK) también fue capaz de inhibir la quimiotaxis de neutrófilos inducida por IL-8 y Gro-alfa con valores de CI_{50} de 16 y 20 nM, respectivamente (Fig. 13).

El análisis por SPR mostró que la Evasina-3 producida en células de mamífero o en E. coli es altamente selectiva para la unión de CXCL8/IL-8, CXCL1/Gro-alfa, CXCL1/KC murina y CXCL2/MIP-2 murina. Ninguna proteína recombinante fue capaz de unir otras quimioquinas ensayadas; CCL5/RANTES, CX3CL1/Fractalquina, CCL11/eotaxina, CCL3/MIP-1-alfa, CCL4/MIP-beta, CCL18/PARC, CCL2/MCP-1 y CXCL12/SDF-1-alfa (Fig. 14). Los parámetros de afinidad (K_d) y cinéticos determinados por SPR (Figs 15 y 16) para Evasina-3-6His y Evasina-3 se muestran en la Tabla V.

La actividad inhibidora de Evasina-1 se demostró además por su capacidad de inhibir el reclutamiento de neutrófilos inducido por la administración del quimioatrayente de neutrófilos murino, KC, a dosis que varían de 0,01-100 µg/ratón (Fig. 17).

Por lo tanto, puede concluirse que la Evasina-3 es una nueva proteína de unión a quimioquinas CXC que podría tener como diana el reclutamiento de neutrófilos. Esta proteína puede ser aplicada de manera útil en la medicina humana como un compuesto anti-inflamatorio, así como en problemas de indicaciones médicas y veterinarias relacionadas con los efectos parasíticos de las garrapatas, incluyendo los agentes infecciosos transmitidos por las garrapatas. Las moléculas basadas en las proteínas de la invención y que interfieren con la función de dichas proteínas, podrían interrumpir el ciclo de vida de la garrapata, controlar los ectoparásitos y sus patógenos o reducir la capacidad de las garrapatas para transmitir organismos causantes de enfermedades.

TABLA I

Aminoácido	Grupo Sinónimo	Grupos Sinónimos Más Preferidos
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp

TABLA II

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, L-I-thioazolidine-4-carboxylic acid, D-or L-1-oxazolidine-4-carboxylic acid
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, .beta.-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, or 5-phenylproline, AdaA, AdaG, cis-3,4, or 5-phenylproline, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

Tabla III

Cebador	Secuencia (5'-3')
Evasina3 PCR1F	GCAGGCTTC <u>CGCCACC</u> AT GGTGTGCGATGAAGACAAC
Evasina3 PCR1R	<i>TGATGGTGATGGTGACGCCTTACA</i> ACTGGTGGTTC
Evasina3 PCR2F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC <u>CGCCAC</u>
Evasina3 PCR2R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TCA ATGGTGATGGTGATGGTGA
pEAK12F	GCCAGCTTGGCACTTGATGT
pEAK12R	GATGGAGGTGGACGTGTCAG
pDEST8F	TCTTCTACGGCAAGGTGCTG
pDEST8R	AAGCAAGTAAACCTCTACA
Evasina3- 6HisF	ACCAGTTGTAAGGCGTCACCATCACCATCACC TTA AGGAGATGACCTAC
Evasina3- 6HisR	TAGGTCATCTCCT TA ATGGTGATGGTGATGGTGACGCCTTACA ACT GGTG
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG

Secuencia subrayada = secuencia Kozak

Negrita = Codón de inicio/Codón de parada

Secuencia *en itálica* = Etiqueta His

Tabla IV

Cebador	Secuencia (5'-3')
5'NdeI- eva3_ecoli	GGAATTCCAT ATG CTTGTTTCAACTATTG
3'XhoI- eva3_ecoli	CGCTCGAG TTATTA ACGCCTTACA ACT GGTGGTTC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
PRSET-R	TGGCAGCAGCCA ACT CAGCTT

5

Negrita = Codón de inicio

Itálica = Codón de parada

Tabla V

	Evasina-3-6His			Evasina-3		
	a (1/Ms)	d (1/s)	d (nM)	a (1/Ms)	d (1/s)	d (nM)
CXCL8/IL-8	8.26×10^5	1.78×10^{-4}	0.22	6.03×10^5	3.20×10^{-4}	0.53
CXCL1/Gro-	2.60×10^6	1.17×10^{-3}	0.45	2.23×10^6	2.69×10^{-3}	1.21
CXCL1/KC murina	2.25×10^5	1.2×10^{-3}	5.34	5.14×10^5	2.35×10^{-3}	4.56
CXCL2/MIP-2 Murina	1.43×10^6	2.55×10^{-4}	0.18	1.05×10^6	8.78×10^{-4}	0.84

REFERENCIAS

- Alarcon-Chaidez FJ et al., *Parasite Immunol*, 25: 69-77, 2003.
- Aljamali MN et al., *Insect Mol Biol*, 12: 299-305, 2003.
- Baggiolini M et al., *Annu Rev Immunol*, 15: 675-705, 1997.
- Baggiolini M, *J Intern Med*, 250: 91-104, 2001.
- Beck CG et al., *J Biol Chem*, 276: 43270-43276, 2001.
- Ben-Bassat A, *Bioprocess Technol.*, 12:147-159, 1991
- Brown A et al., *J Pept Sci*, 2:40-46, 1996.
- Burns JM et al., *J Biol Chem.*, 277:2785-2789, 2002.
- Bursill CA et al., *Circulation*, 110: 2460-2466, 2004.
- Chuang VT et al., *Pharm Res.*, 19: 569-577, 2002.
- Clackson et al., *Nature*, 352:624-628, 1991.
- Cleland JL et al., *Curr Opin Biotechnol*, 12: 212-9, 2001.
- Coleman R et al., *Drug Discov Today*, 6: 1116-1126, 2001.
- Dougherty DA, *Curr Opin Chem Biol*, 4: 645-52, 2000.
- Ferreira BR y Silva JS, *Vet Immunol Immunopathol*, 64: 279-293, 1998.
- Gendel SM, *Ann NY Acad SCI*, 964: 87-98, 2002.
- Gillespie RD et al., *J Immunol*, 166: 4319-4326, 2001.
- Golebiowski A et al., *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 428-34, 2001.
- Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) p.59-103
- Graslund T et al., *Protein Expr Purif.*, 9: 125-132, 1997.
- Greenwald RB et al., *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 217-250, 2003.
- Hajnicka,V., et al., *Parasitology* 130:333-342, 2005.
- Harris JM y Chess RB, *Nat Rev Drug Discov*, 2: 214-221, 2003.
- Hill CA y Gutierrez JA, *Med Vet Entomol*, 17: 224-227, 2003.
- Holt LJ et al., *Trends Biotechnol*, 21:484-490, 2003.
- Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol*, 227:381, 1991.
- Hruby VJ y Balse PM, *Curr Med Chem*, 7: 945-970, 2000.
- Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986.

- Kipriyanov SM y Le Gall F, *Mol Biotechnol*, 26:39-60, 2004.
- Kohler et al, *Nature* 256: 495, 1975
- Jensen KK et al., *J Virol*, 77: 624-630, 2003.
- Li A, *Drug Discov Today*, 6: 357-366, 2001.
- Luo B y Prestwich GD, *Exp Opin Ther Patents*, 11: 1395-1410, 2001.
- Madden RD et al., *Exp Appl Acarol*, 32: 77-87, 2004.
- Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991.
- Marshall SA et al., *Drug Disc Today*, 8: 212-221, 2003.
- Mulenga Aet al., *Microbes Infect*, 2: 1353-1361, 2000.
- Murphy LR et al., *Protein Eng*, 13:149-152, 2000.
- Murrell A et al., *Mol Phylogenet Evol*, 21: 244-258, 2001.
- Nilsson J et al., *Protein Expr Purif*, 11: 1-16, 1997.
- Pearson WR, *Methods Mol Biol.*, 132:185-219, 2000.
- Pillai O y Panchagnula R, *Cur Opin Chem Biol*, 5: 447-451, 2001.
- Presta L, *Curr Opin Struct Biol*, 13: 519-525, 2003.
- Pyo R et al., *Am J Pathol*, 164: 2289-2297, 2004.
- Rapoport TA et al., *Annu Rev Biochem.*, 65:271-303, 1996.
- Rogov SI y Nekrasov AN, *Protein Eng*, 14: 459-463, 2001.
- Scatchard G., *Ann NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949
- Schellekens H, *Nat Rev Drug Disc*, 1: 457-462, 2002.
- Seet BT et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9008-9013, 2001.
- Ullmann AJ et al., *Exp Appl Acarol*, 28: 107-126, 2002.
- Vaitukaitis et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 33, p. 988,1971
- Valenzuela JG, *Am J Trop Med Hyg*, 66: 223-224, 2002.
- Vasserot AP et al., *Drug Disc Today*, 8: 118-126, 2003.

Van Valkenburgh HA y Kahn RA, Methods Enzymol., 344:186-193, 2002.

Villain M et al., Chem Biol, 8: 673-679, 2001.

Wang H et al., Exp Appl Acarol 1999, 23: 969-975, 1999.

Ward et al., Nature 341 :544, 1989

Webb LM et al., FASEB J, 18: 571-573, 2004.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Nuevos antagonistas de Quimioquinas CXC

<130> 1106 wo

5 <150> EP 05110205.1

<151> 2005-10-31

<150> US 60/733.547

<151> 2005-11-04

<160> 26

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 247

<212> PRT

<213> Virus Ectromelia

15 <400>

Met Lys Gln Tyr Ile Val Leu Ala Cys Ile Cys Leu Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ile Pro Thr Ser Leu Gln Gln Ser Phe Ala Ser Ser Cys Thr Glu Glu
20 25 30

Glu Asn Asn His His Met Gly Ile Asp Val Ile Ile Lys Val Thr Lys
35 40 45

Gln Asp Gln Thr Pro Thr Asn Asp Lys Ile Cys Gln Ser Val Thr Glu
50 55 60

Val Thr Glu Ser Glu Asp Asp Gly Val Ser Glu Glu Val Val Lys Gly
65 70 75 80

Asp Pro Thr Thr Tyr Tyr Thr Val Val Gly Gly Gly Leu Arg Met Asn
85 90 95

Phe Gly Phe Thr Lys Cys Pro Gln Ile Lys Ser Ile Ser Glu Ser Ala
100 105 110

Asp Gly Asn Thr Val Asn Ala Arg Leu Ser Ser Val Ser Pro Met Tyr
115 120 125

Gly Ile Glu Ser Pro Ala Ile Thr His Glu Glu Ala Leu Ala Met Ile
130 135 140

Asn Asp Cys Ala Val Ser Ile Asn Ile Lys Cys Ser Glu Glu Glu Lys
145 150 155 160

Asp Ser Asn Ile Lys Thr His Pro Val Leu Gly Ser Asn Ile Ser His
165 170 175

Lys Lys Val Arg Tyr Glu Asp Ile Ile Gly Ser Thr Ile Val Asp Ile
180 185 190

Lys Cys Val Lys Asp Leu Glu Phe Ser Val Arg Ile Gly Asp Met Cys
195 200 205

Lys Glu Ala Ser Glu Leu Glu Val Lys Asp Gly Phe Lys Tyr Ile Asp
210 215 220

Gly Ser Val Ser Glu Gly Ala Thr Asp Asp Thr Ser Leu Ile Asp Ser
225 230 235 240

Thr Lys Leu Lys Ala Cys Val
245

<210> 2

<211> 744

<212> ADN

5 <213> Virus Ectromelia

<400> 2

atgaaacaat atatcgctct ggcattgcata tgcctggcgg cagctgctat ccctaccagt	60
cttcagcaat cattcgcatt ctcgtgtacg gaagaagaaa acaaccatca tatgggaatc	120
gatgttatta tcaaagtcac caagcaagac caaacaccga ctaatgataa gatttgtcaa	180
tcagtaaccg aagttacaga gtctgaagac gatgggggtat ccgaagaagt cgtaaaagga	240
gatcccacca cttattacac tgtcgtcggg ggaggtctga gaatgaactt tggattcacc	300

aaatgtcctc agattaaatc catctcagaa tccgctgatg gaaacacagt gaatgctcgg 360
 ttgtctagcg tctctccaat gtacggcatt gaatctccag ccatcactca tgaagaagct 420
 cttgctatga tcaacgactg tgcggtgtct atcaatatca aatgtagtga agaagagaaa 480
 gacagcaaca tcaagaccca tccagtactc ggggtctaaca tctctcataa gaaagtgagg 540
 tacgaagata tcatcgggtc aacgatcgtc gatataaaat gtgtcaagga tctagagttt 600
 agcgttcgta tcggagacat gtgcaaggaa gcatctgaac ttgaagtcaa ggatggattc 660
 aagtatatcg acggatcggg atctgaagggt gcaaccgatg atacttcact catcgattca 720
 acaaaaactca aagcgtgtgt ctga 744

<210> 3

<211> 491

<212> ADN

5 <213> Rhipicephalus sanguineus

<220>

<221> misc_feature

<222> (468)..(468)

<223> n e s a , c , g o t

10 <400> 3

cggccggggg agcaaacatc gcagttgctg aacggttgcg ctcgtcttat aagcaggagt 60
 aataccggtg atcagagggc gtataacggt aaggaaggta gtgagcttat tcctttgtac 120
 gagacattgt gcatcgcagg tatggtgtcg atgaagacaa cgcacatgt cctatttctg 180
 ctagttgctt tggaatcaat gcgaccctac acgactgctc ttgtttcaac tattgagtca 240
 agaacgagtg gagatggcgc agataacttt gatgtagtat cttgtaataa gaattgcact 300
 tcagggtcaaa acgaatgcc tgaaggctgt ttttgcggtc tgttgggcca gaacaaaaaa 360
 ggtcattgct acaaaaattat aggggaacctt tctggagaac caccagttgt aaggcgtaa 420
 ggagatgacc tacagctcag atgaataata aaaaaaatta agactaanaa aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa a 491

<210> 4

<211> 279

<212> ADN

15 <213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 4

atggtgtcga tgaagacaac gcatcatgtc ctatttctgc tagttgcttt ggaatcaatg 60
cgacctaca cgactgctct tgtttcaact attgagtcaa gaacgagtgg agatggcgca 120
gataactttg atgtagtatt ttgtaataag aattgcactt cagggtcaaaa cgaatgccct 180
gaaggctggt tttgcggctt gttgggccag aacaaaaaag gtcattgcta caaaattata 240
gggaaccttt ctggagaacc accagttgta aggcgttaa 279

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

5 <213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 5

Met Val Ser Met Lys Thr Thr His His Val Leu Phe Leu Leu Val Ala
1 5 10 15
Leu Glu Ser Met Arg Pro Tyr Thr Thr Ala Leu Val Ser Thr Ile Glu
20 25 30
Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp Asn Phe Asp Val Val Ser Cys
35 40 45
Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn Glu Cys Pro Glu Gly Cys Phe
50 55 60
Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys Gly His Cys Tyr Lys Ile Ile
65 70 75 80
Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val Val Arg Arg
85 90

<210> 6

<211> 66

10 <212> PRT

<213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 6

Leu Val Ser Thr Ile Glu Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp Asn
1 5 10 15

Phe Asp Val Val Ser Cys Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn Glu
20 25 30

Cys Pro Glu Gly Cys Phe Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys Gly
35 40 45

His Cys Tyr Lys Ile Ile Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val Val
50 55 60

Arg Arg
65

<210> 7

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Construcción sintética

<400> 7

gcaggcttcg ccaccatggt gtcgatgaag acaac

35

<210> 8

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 8

tgatggatgat ggtgacgcct tacaactggt gggtc

35

<210> 9

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 9

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgccac

36

20 <210> 10

<211> 51

<212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 10

25 **ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt caatggatgat ggtgatgggtg a**

51

<210> 11

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Construcción sintética		
	<400> 11		
5	gccagcttgg cacttgatgt	20	
	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Construcción sintética		
10	<400> 12		
	gatggagggtg gacgtgtcag	20	
	<210> 13		
	<211> 20		
	<212> ADN		
15	<213> Construcción sintética		
	<400> 13		
	tcttctacgg caaggtgctg	20	
	<210> 14		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Construcción sintética		
	<400> 14		
	aagcaagtaa aacctctaca	20	
	<210> 15		
25	<211> 294		
	<212> ADN		
	<213> Construcción sintética		
	<400> 15		
	atggtgtcga tgaagacaac gcatcatgtc ctatttctgc tagttgcttt ggaatcaatg	60	
	cgaccctaca cgactgctct tgtttcaact attgagtcaa gaacgagtgg agatggcgca	120	
	gataactttg atgtagtadc ttgtaataag aattgcactt cagggtcaaaa cgaatgccct	180	
	gaaggctggtt tttgcggctt gttgggcccag aacaaaaaag gtcattgcta caaaattata	240	
	gggaaccttt ctggagaacc accagttgta aggcgtcacc atcaccatca ccat	294	
30	<210> 16		
	<211> 20		

<212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 16

taatacgact cactataggg

20

5 <210> 17

<211> 98

<212> PRT

<213> Construcción sintética

<400> 17

Met Val Ser Met Lys Thr Thr His His Val Leu Phe Leu Leu Val Ala
1 5 10 15

Leu Glu Ser Met Arg Pro Tyr Thr Thr Ala Leu Val Ser Thr Ile Glu
20 25 30

Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp Asn Phe Asp Val Val Ser Cys
35 40 45

Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn Glu Cys Pro Glu Gly Cys Phe
50 55 60

Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys Gly His Cys Tyr Lys Ile Ile
65 70 75 80

Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val Val Arg Arg His His His His
85 90 95

10 His His

<210> 18

<211> 72

<212> PRT

<213> Construcción sintética

15 <400> 18

Leu Val Ser Thr Ile Glu Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp Asn
1 5 10 15

Phe Asp Val Val Ser Cys Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn Glu
20 25 30

Cys Pro Glu Gly Cys Phe Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys Gly
35 40 45

His Cys Tyr Lys Ile Ile Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val Val
50 55 60

Arg Arg His His His His His His
65 70

<210> 19

<211> 50

<212> ADN

5 <213> Construcción sintética

<400> 19

accagttgta aggcgtcacc atcaccatca ccattaagga gatgacctac

50

<210> 20

<211> 50

10 <212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 20

taggtcatct ccttaatggt gatggtgatg gtgacgcctt acaactggtg

50

<210> 21

15 <211> 29

<212> ADN

<213> Construcción sintética

<400> 21

20 **ggaattccat atgcttggtt caactattg**

29

<210> 22

<211> 35

<212> ADN

<213> Construcción sintética

25 <400> 22

cgctcgagtt attaacgcct tacaactggt gggttc

35

	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Construcción sintética	
5	<400> 23	
	taatacgact cactataggg	20
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Construcción sintética	
	<400> 24	
	tggcagcagc caactcagct t	21
	<210> 25	
	<211> 203	
15	<212> ADN	
	<213> E. coli	
	<400> 25	
	atgcttggtt caactattga gtcaagaacg agtggagatg ggcagataa ctttgatgta	60
	gtatcttgta ataagaattg cacttcaggt caaaacgaat gccctgaagg ctgtttttgc	120
	ggcttggttg gccagaacaa aaaagggtcat tgctacaaaa ttatagggaa cctttctgga	180
	gaaccaccag ttgtaaggcg tta	203
	<210> 26	
20	<211> 67	
	<212> PRT	
	<213> E. coli	
	<400> 26	

Met Leu Val Ser Thr Ile Glu Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp
1 5 10 15
Asn Phe Asp Val Val Ser Cys Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn
20 25 30
Glu Cys Pro Glu Gly Cys Phe Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys
35 40 45
Gly His Cys Tyr Lys Ile Ile Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val
50 55 60
Val Arg Arg
65

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende:
 - a) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
 - b) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6);
 - 5 c) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17);
 - d) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18);
 - e) la secuencia de aminoácidos de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26); o
 - f) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5) en la que un residuo de cisteína en la posición correspondiente a los residuos 48, 52, 59, 63, 65 ó 76 o la asparagina en la posición 51 ó 82 se ha sustituido.
- 10 2. La proteína aislada según la reivindicación 1, en la que dicha proteína consiste en:
 - a) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
 - b) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6);
 - c) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17);
 - d) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18);
 - 15 e) la secuencia de aminoácidos de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26); o
 - f) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5) en la que un residuo de cisteína en la posición correspondiente a los residuos 48, 52, 59, 63, 65 ó 76 o la asparagina en la posición 51 ó 82 se ha sustituido.
- 20 3. La proteína aislada según la reivindicación 1, en la que dicha proteína comprende además una o más secuencias de aminoácidos elegidas entre las siguientes: un dominio extracelular de una proteína unida a membrana, una región constante de inmunoglobulina, un dominio de multimerización, una hormona proteica heterodimérica, un péptido señal, una señal de exportación o una secuencia etiqueta unida de manera operativa a dicha proteína.
4. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína aislada según la reivindicación 1 ó 3.
5. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que dicha molécula codifica una proteína que comprende:
 - 25 a) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
 - b) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6);
 - c) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17);
 - d) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18);
 - e) la secuencia de aminoácidos de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26); o
 - 30 f) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5) en la que un residuo de cisteína en la posición correspondiente a los residuos 48, 52, 59, 63, 65 ó 76 o la asparagina en la posición 51 ó 82 se ha sustituido.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína aislada según la reivindicación 2.
7. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que dicha molécula codifica una proteína que consiste en:
 - 35 a) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
 - b) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6);
 - c) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS (SEQ ID NO: 17);
 - d) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3-HIS madura (SEQ ID NO: 18);
 - e) la secuencia de aminoácidos de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26); o
 - 40 f) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5) en la que un residuo de cisteína en la posición correspondiente a los residuos 48, 52, 59, 63, 65 ó 76 o la asparagina en la posición 51 ó 82 se ha sustituido.

8. La molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que dicha molécula es una molécula de ADN, particularmente una molécula de ADNc.
9. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que dicha molécula comprende o es una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 3 ó 15.
- 5 10. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que dicha molécula comprende o es una secuencia de ADN de SEQ ID NO: 4 ó 25.
11. Un vector de clonación o de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.
- 10 12. Un vector de expresión según la reivindicación 11 que comprende además un promotor asociado de manera operativa con dicha molécula de ácido nucleico, en particular un promotor específico de tejido, uno constitutivo o uno inducible.
13. Una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión según la reivindicación 11 ó 12.
14. Un proceso para preparar una proteína aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 13 bajo condiciones que permitan o estimulen la expresión de dicha proteína.
- 15 15. El proceso según la reivindicación 14, que comprende además purificar la proteína.
16. El proceso según la reivindicación 14 ó 15, que comprende además formular la proteína para la administración a seres humanos.
17. Un anticuerpo que se une selectivamente a una proteína que tiene:
 - 20 a) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 (SEQ ID NO: 5);
 - b) la secuencia de aminoácidos de Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 6); o
 - c) la secuencia de aminoácidos de Met-Evasina-3 madura (SEQ ID NO: 26).
18. Un anticuerpo según la reivindicación 17, que es un anticuerpo monoclonal.
19. Una composición farmacéutica que comprende una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 20. Una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica según la reivindicación 19 para usarse como un medicamento.

Fig. 1

```

1  CGGCCGGGGG AGCAAACATC GCAGTTGCTG AACGGTTGCG CTCGTCTTAT AAGCAGGAGT
61 AATACCGGTG ATCAGAGGGC GTATAACGGT AAGGAAGGTA GTGAGCTTAT TCCTTTGTAC

121 GAGACATTGT GCATCGCAGG T ATG GTG TCG ATG AAG ACA ACG CAT CAT GTC
    Met Val Ser Met Lys Thr Thr His His Val

172 CTA TTT CTG CTA GTT GCT TTG GAA TCA ATG CGA CCC TAC ACG ACT GCT
    Leu Phe Leu Leu Val Ala Leu Glu Ser Met Arg Pro Tyr Thr Thr Ala

220 CTT GTT TCA ACT ATT GAG TCA AGA ACG AGT GGA GAT GGC GCA GAT AAC
    Leu Val Ser Thr Ile Glu Ser Arg Thr Ser Gly Asp Gly Ala Asp Asn

268 TTT GAT GTA GTA TCT TGT AAT AAG AAT TGC ACT TCA GGT CAA AAC GAA
    Phe Asp Val Val Ser Cys Asn Lys Asn Cys Thr Ser Gly Gln Asn Glu

316 TGC CCT GAA GGC TGT TTT TGC GGC TTG TTG GGC CAG AAC AAA AAA GGT
    Cys Pro Glu Gly Cys Phe Cys Gly Leu Leu Gly Gln Asn Lys Lys Gly

364 CAT TGC TAC AAA ATT ATA GGG AAC CTT TCT GGA GAA CCA CCA GTT GTA
    His Cys Tyr Lys Ile Ile Gly Asn Leu Ser Gly Glu Pro Pro Val Val

412 AGG CGT TAA GGAGATGACC TACAGCTCAG ATGAATAATA AAAAAAATTA AGACTAANAA
    Arg Arg Stop

471 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAANCCTTGT CGGCCGCCT

```

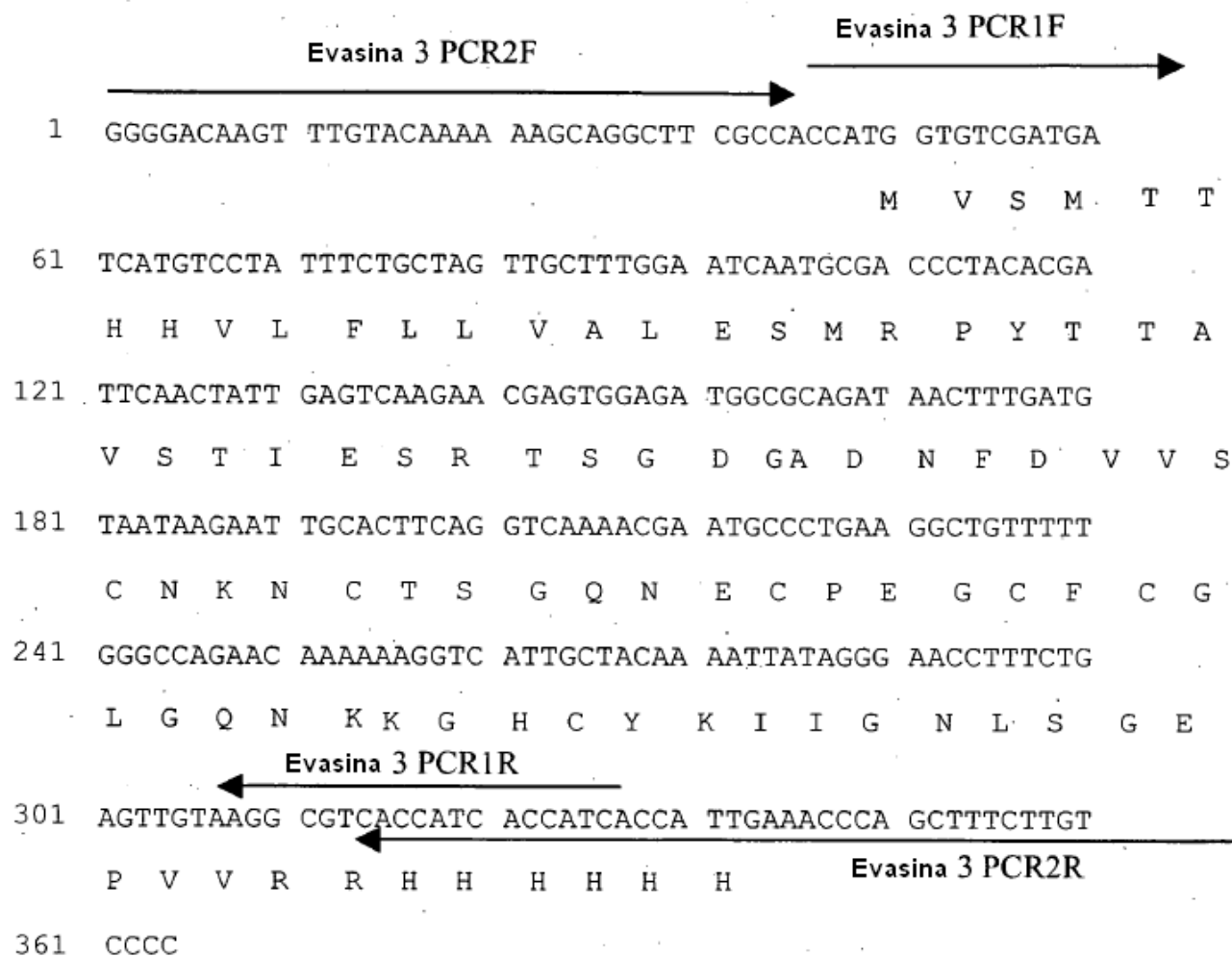
Fig. 2

Fig . 3.

A

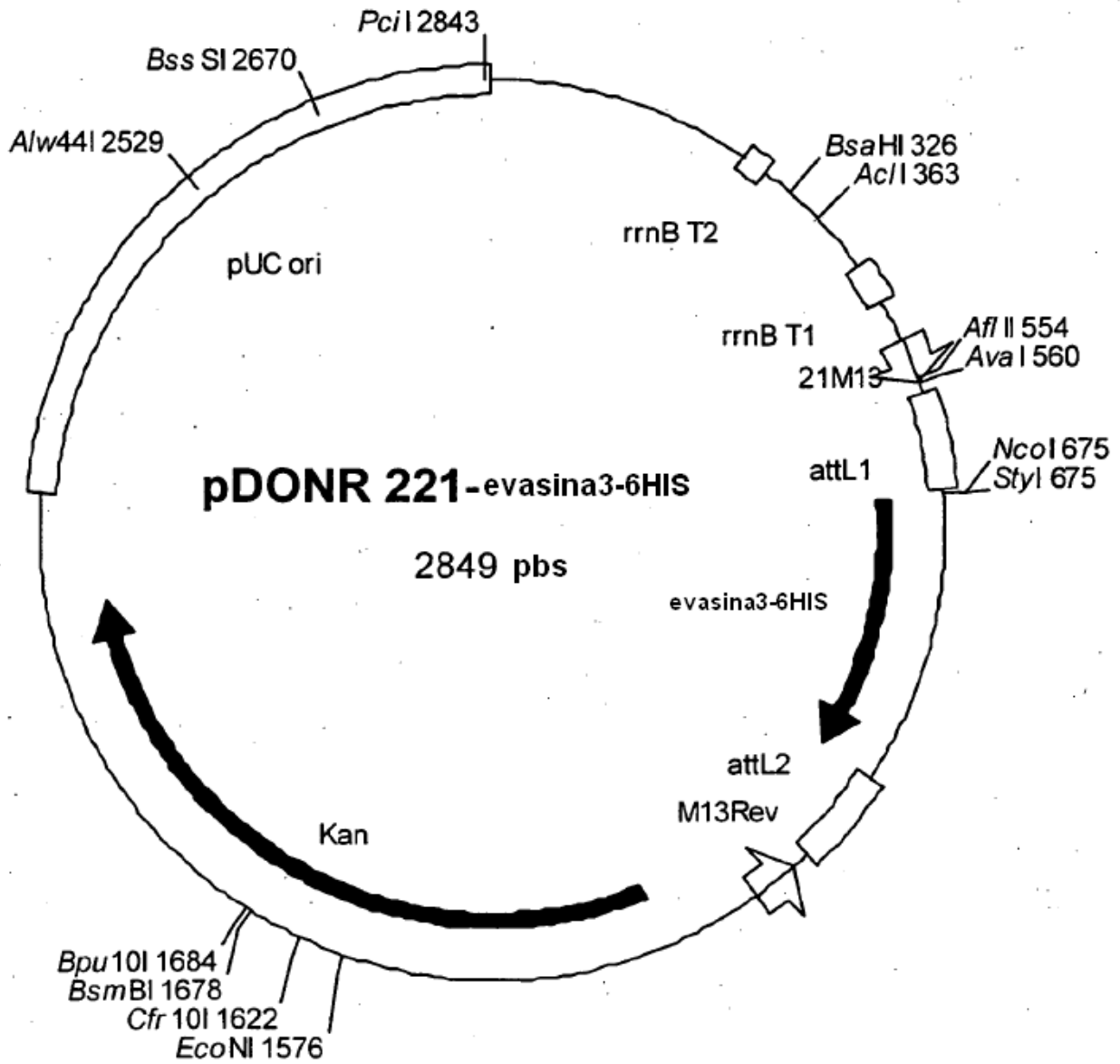


Fig . 3.

B

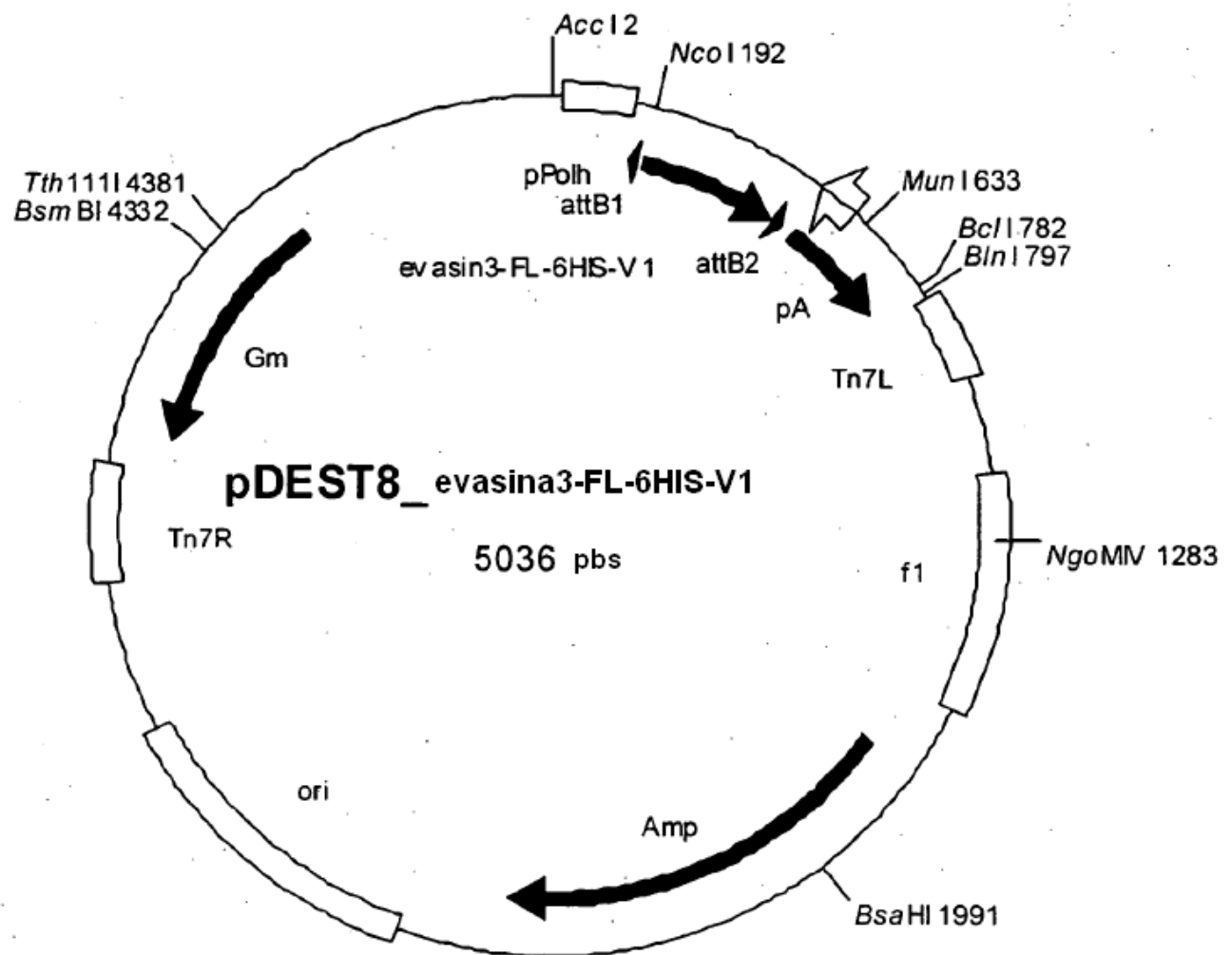


Fig . 3.

C

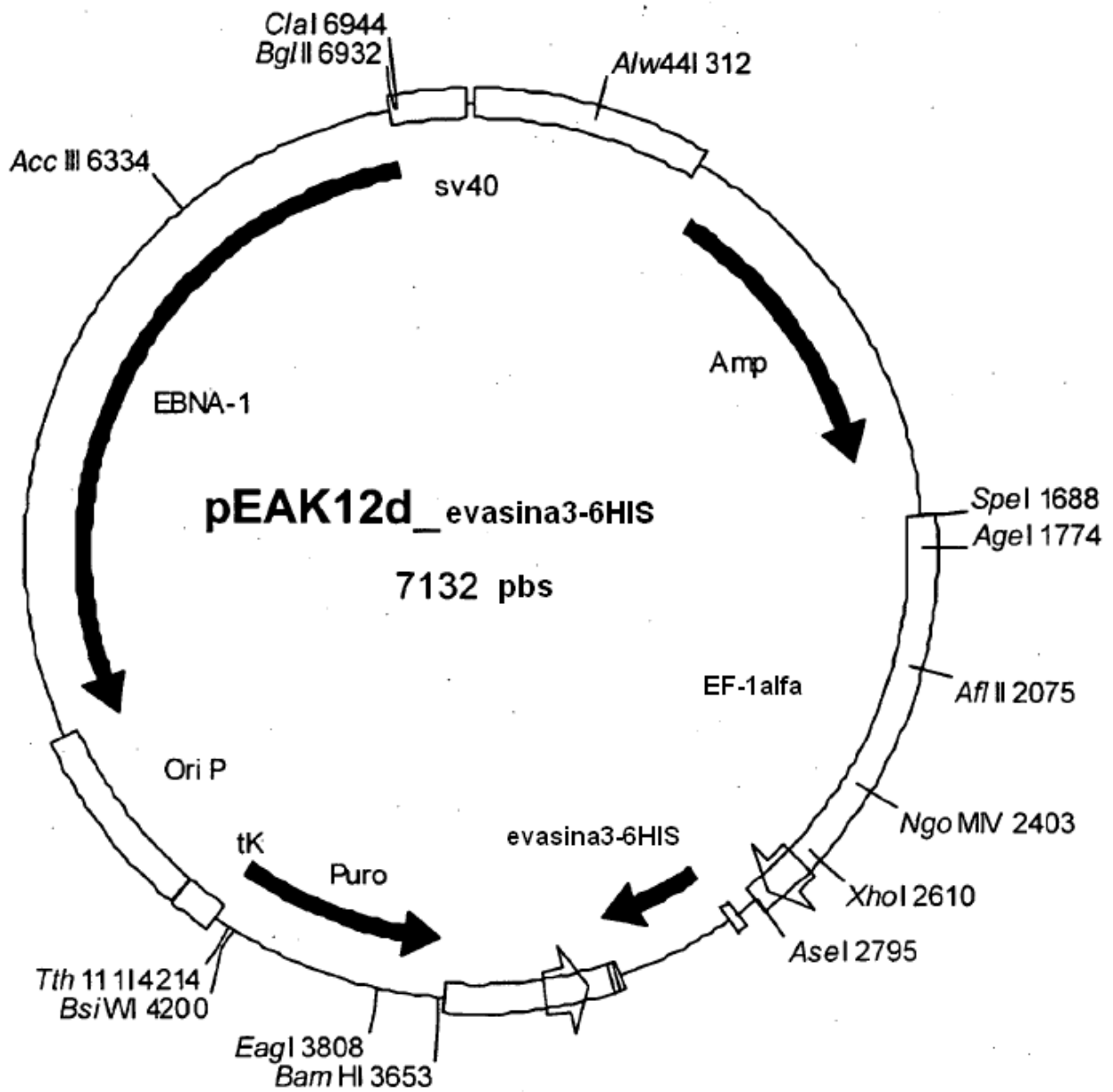


Fig. 3.

D

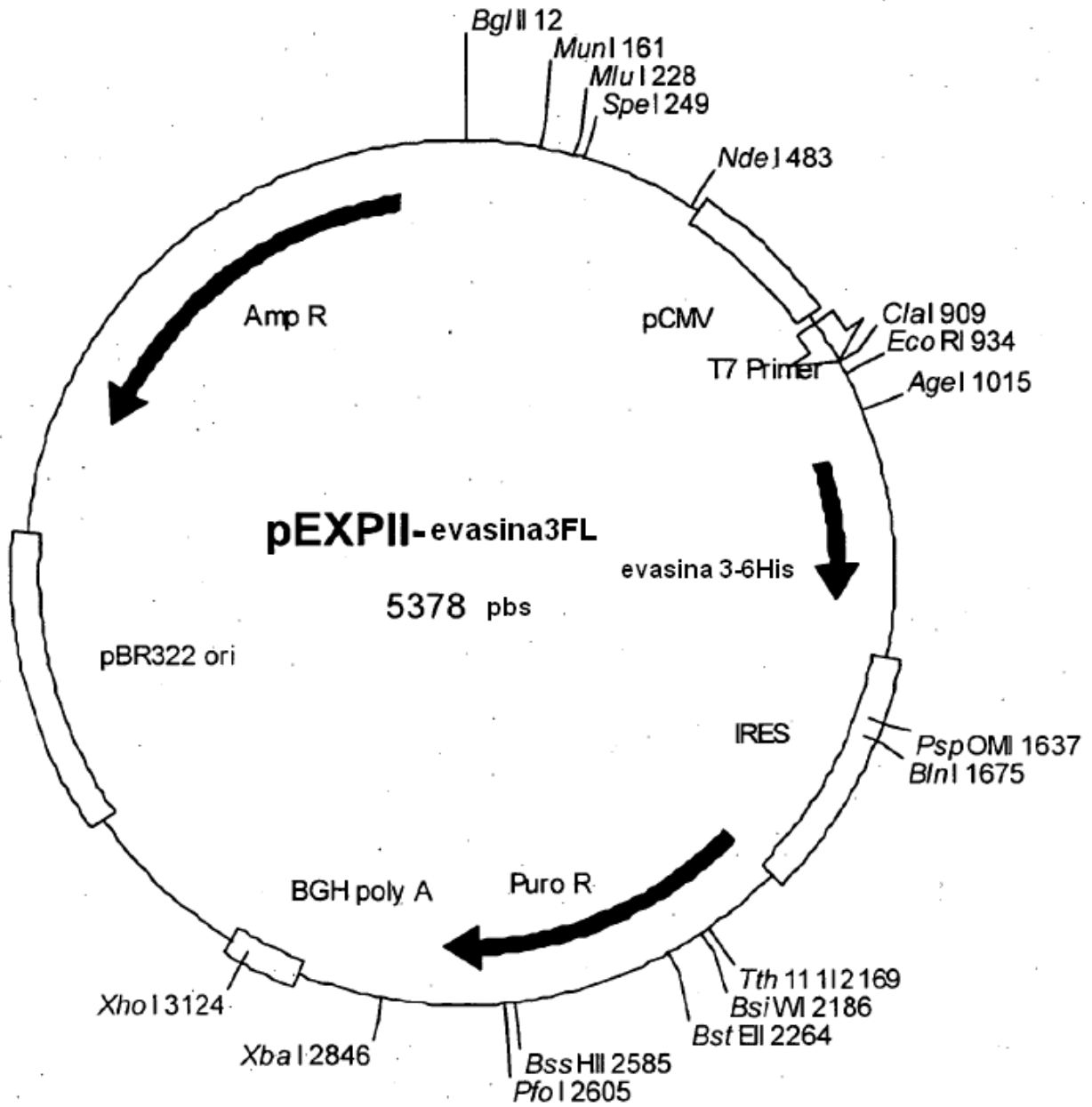


Fig. 4

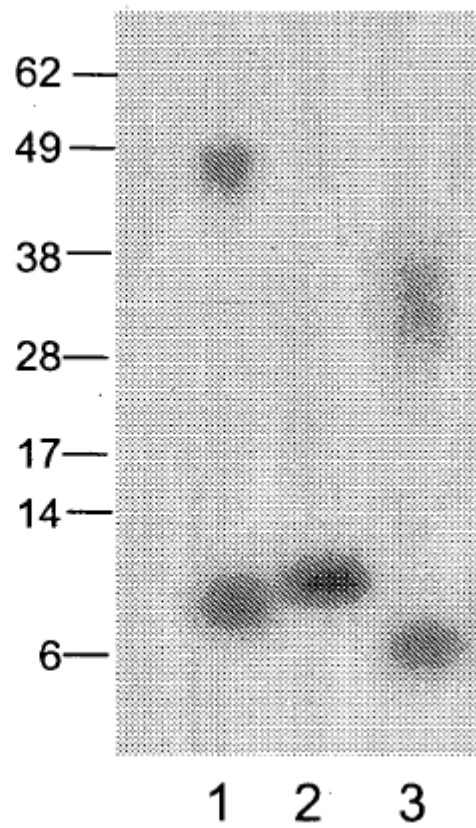


Fig. 5

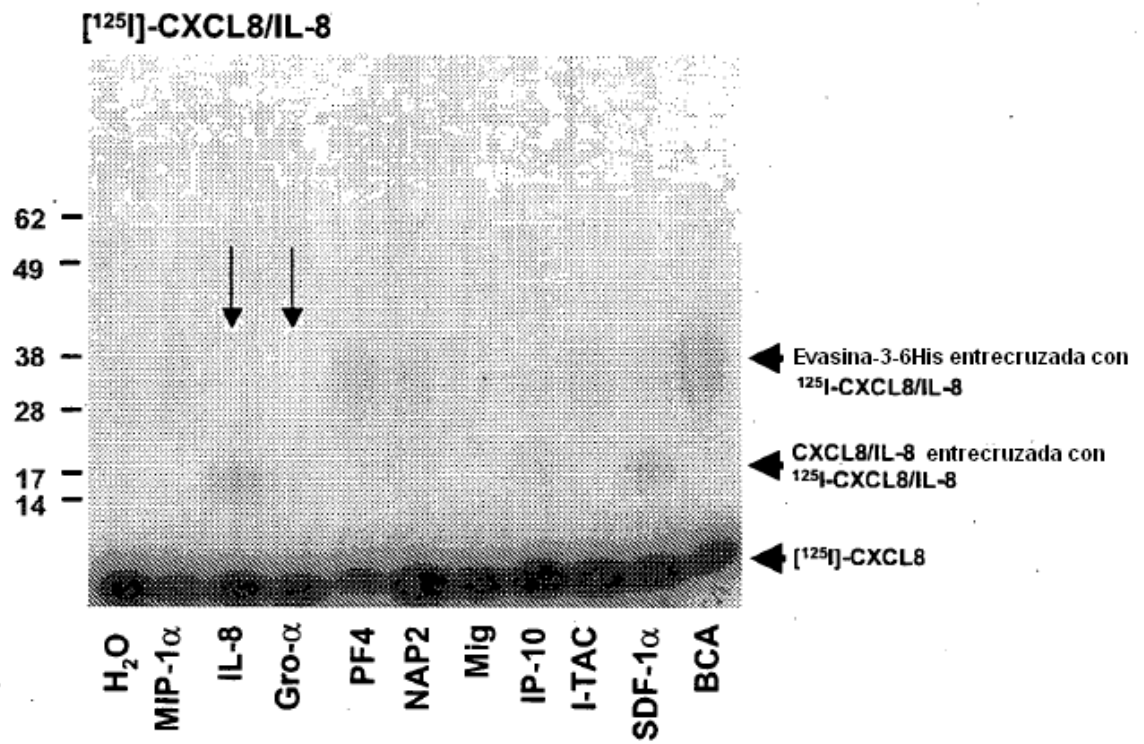


Fig. 6

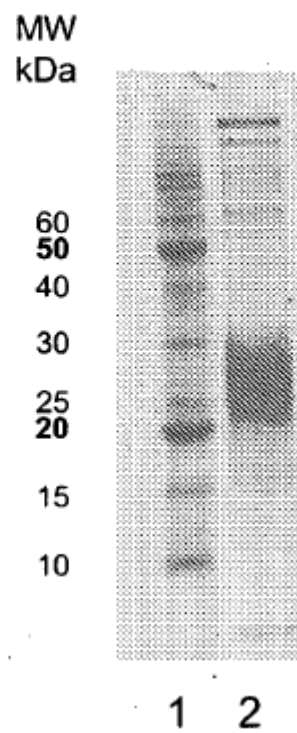


Fig. 7

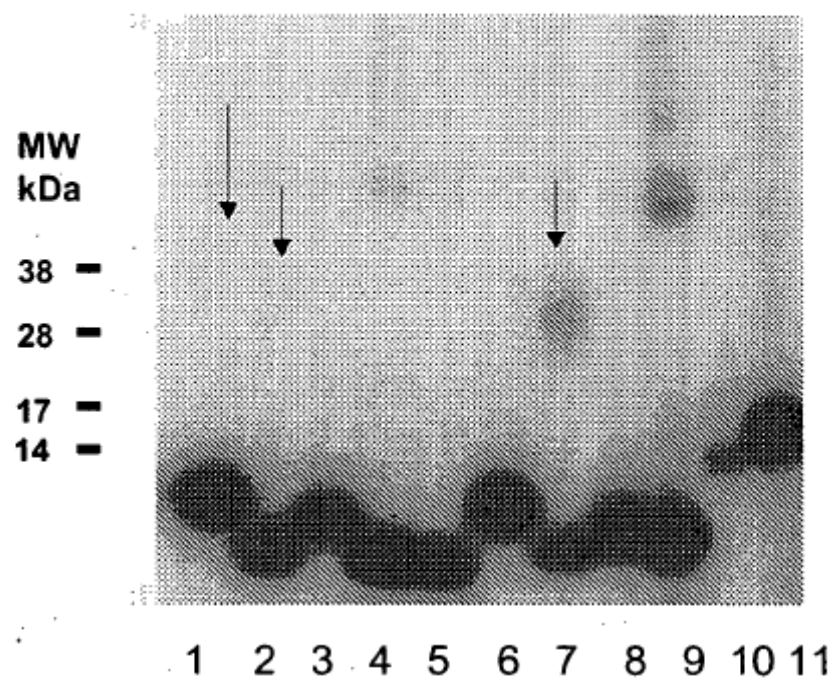


Fig. 8

5'NdeI-eva3 *ecoli*

1 GGAATTCCAT **ATG**CTTGTTT CAACTATTGA GTCAAGAACG AGTGGAGATG
M L V S T I E S R T S G D

51 GCGCAGATAA CTTTGATGTA GTATCTTGTA ATAAGAATTG CACTTCAGGT
G A D N F D V V S C N K N C T S G

101 CAAAACGAAT GCCCTGAAGG CTGTTTTTGC GGCTTGTTGG GCCAGAACAA
Q N E C P E G C F C G L L G Q N

151 AAAAGGTCAT TGCTACAAAA TTATAGGGAA CCTTTCTGGA GAACCACCAG
K K G H C Y K I I G N L S G E P P

3'XhoI-eva3 *ecoli*

201 TTGTAAGGCG TTAATAACTC GAGCGG
V V R R

Fig. 9

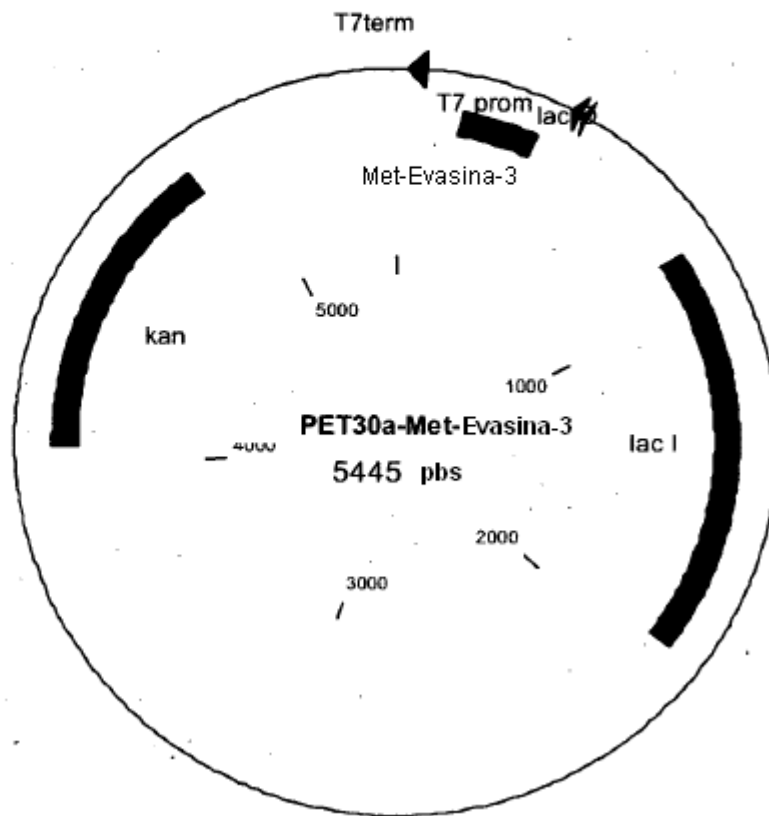


Fig. 10

**Marcadores
de Peso
Molecular** **Met-evasina-3**

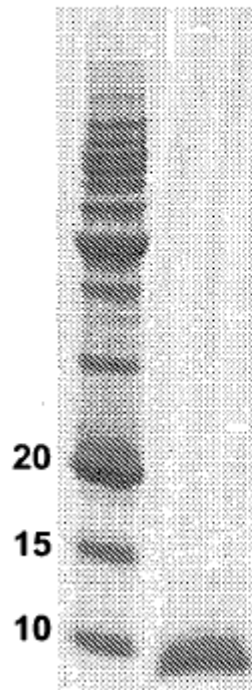


Fig. 11

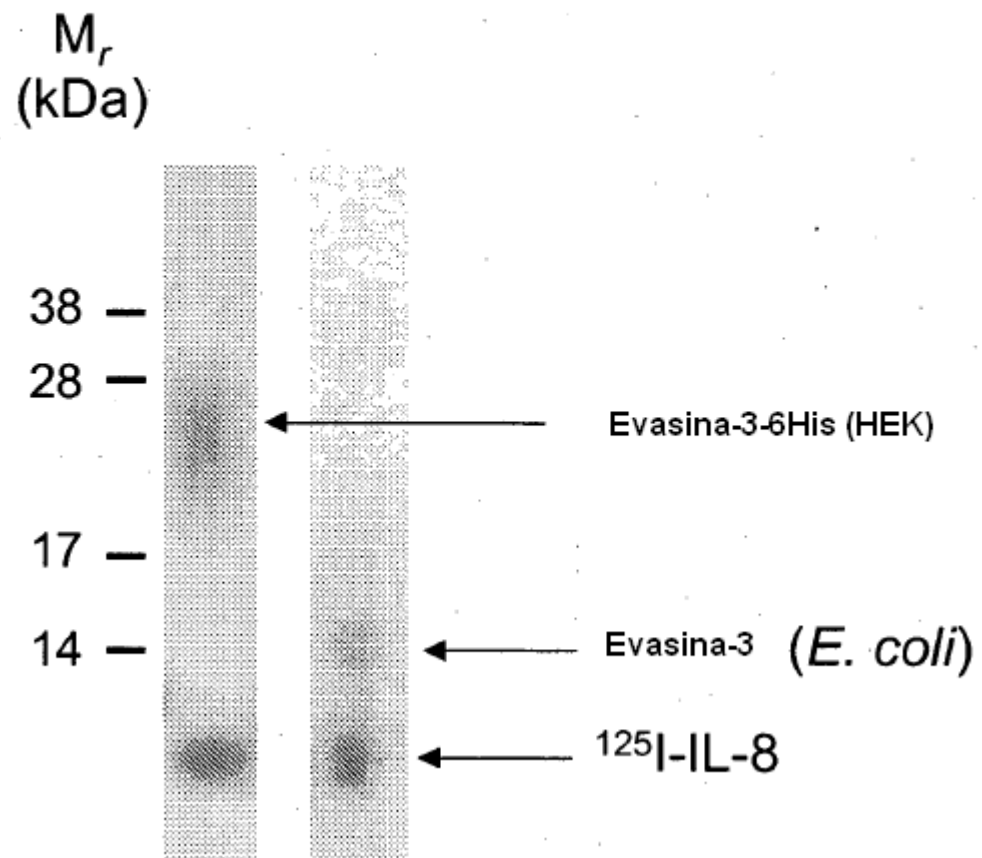
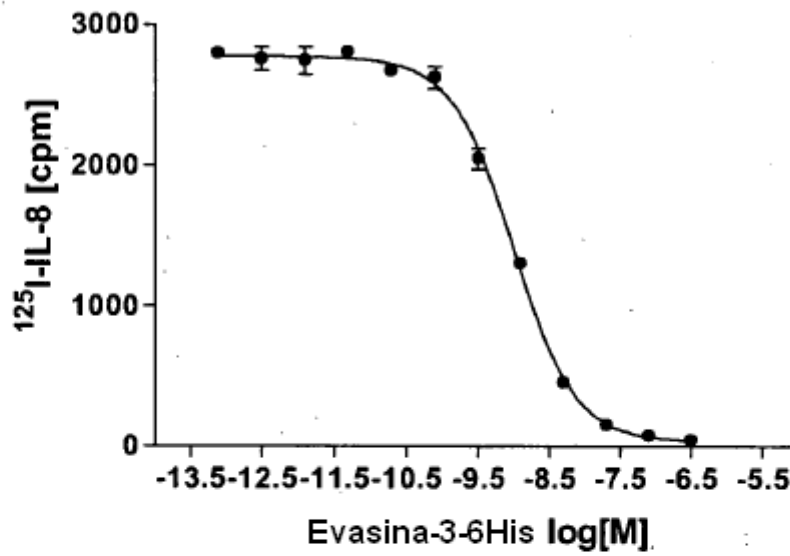


Fig. 12

A)



B)

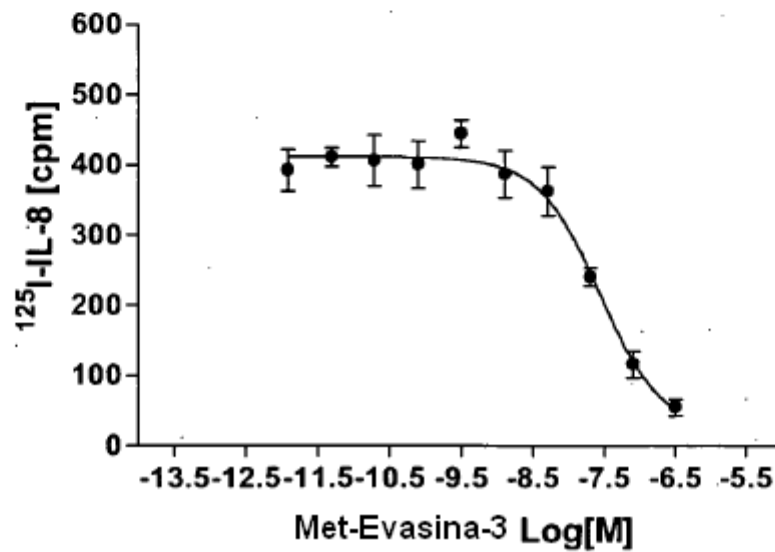


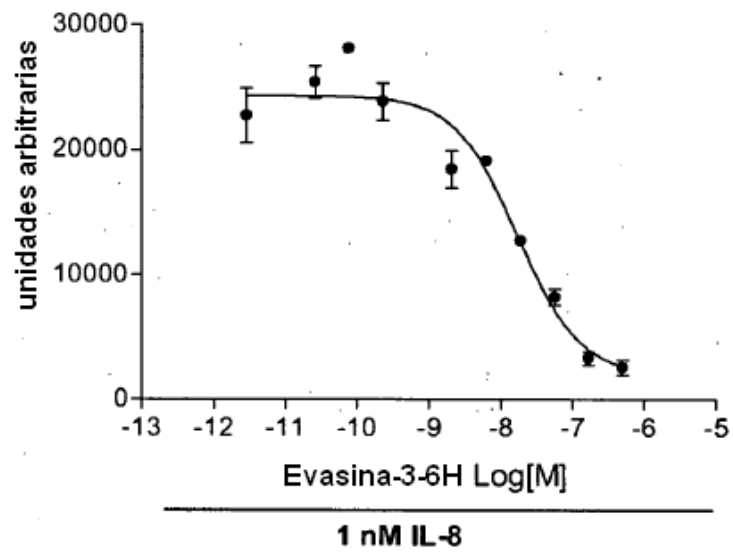
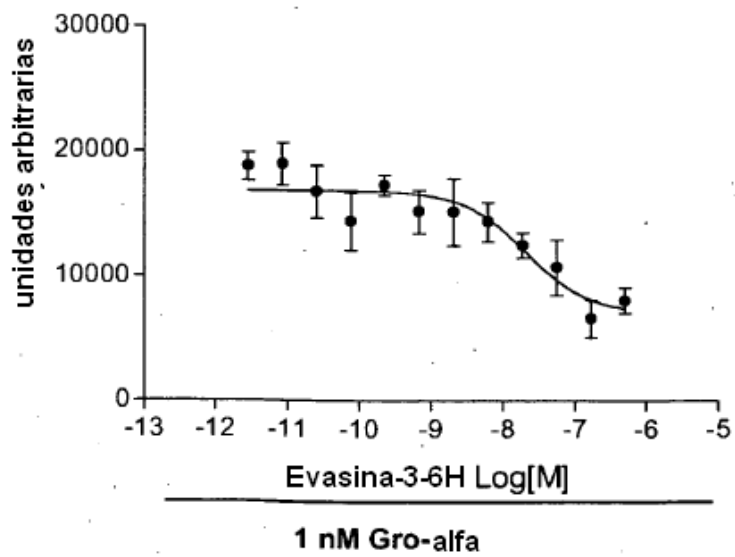
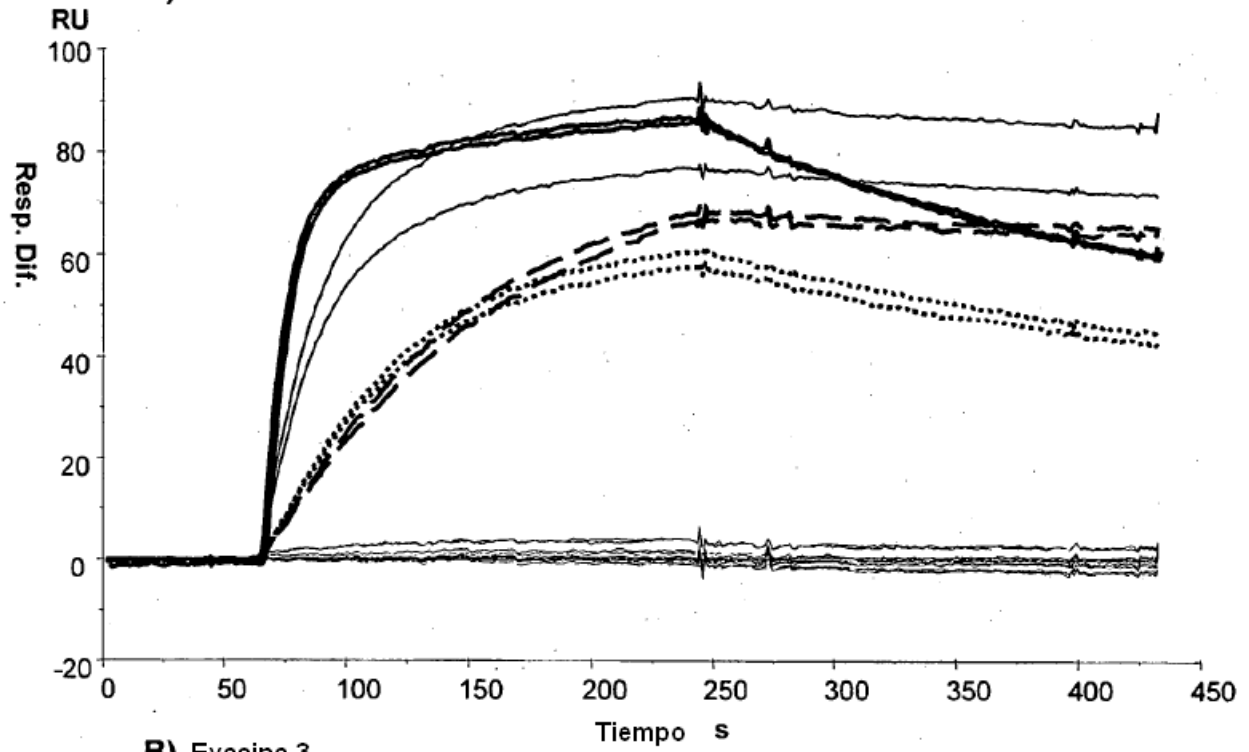
Fig. 13**A)****B)**

Fig. 14

A) Evasina-3-6His



B) Evasina-3

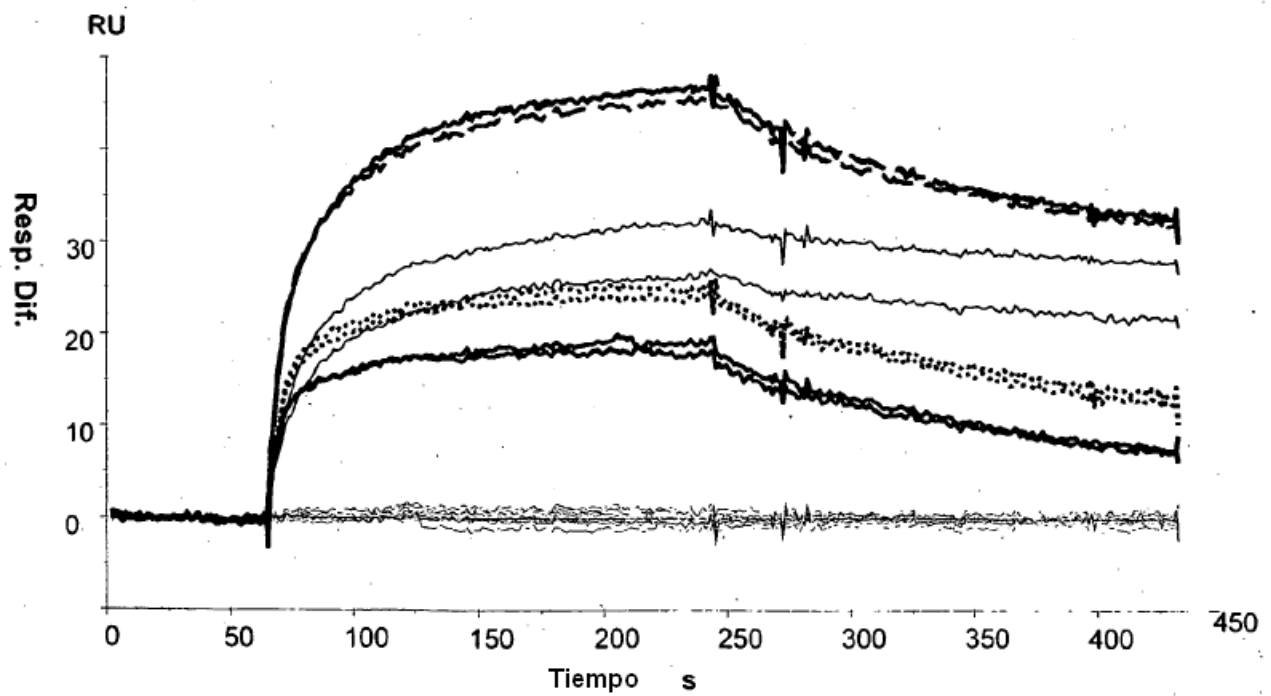


Fig. 15

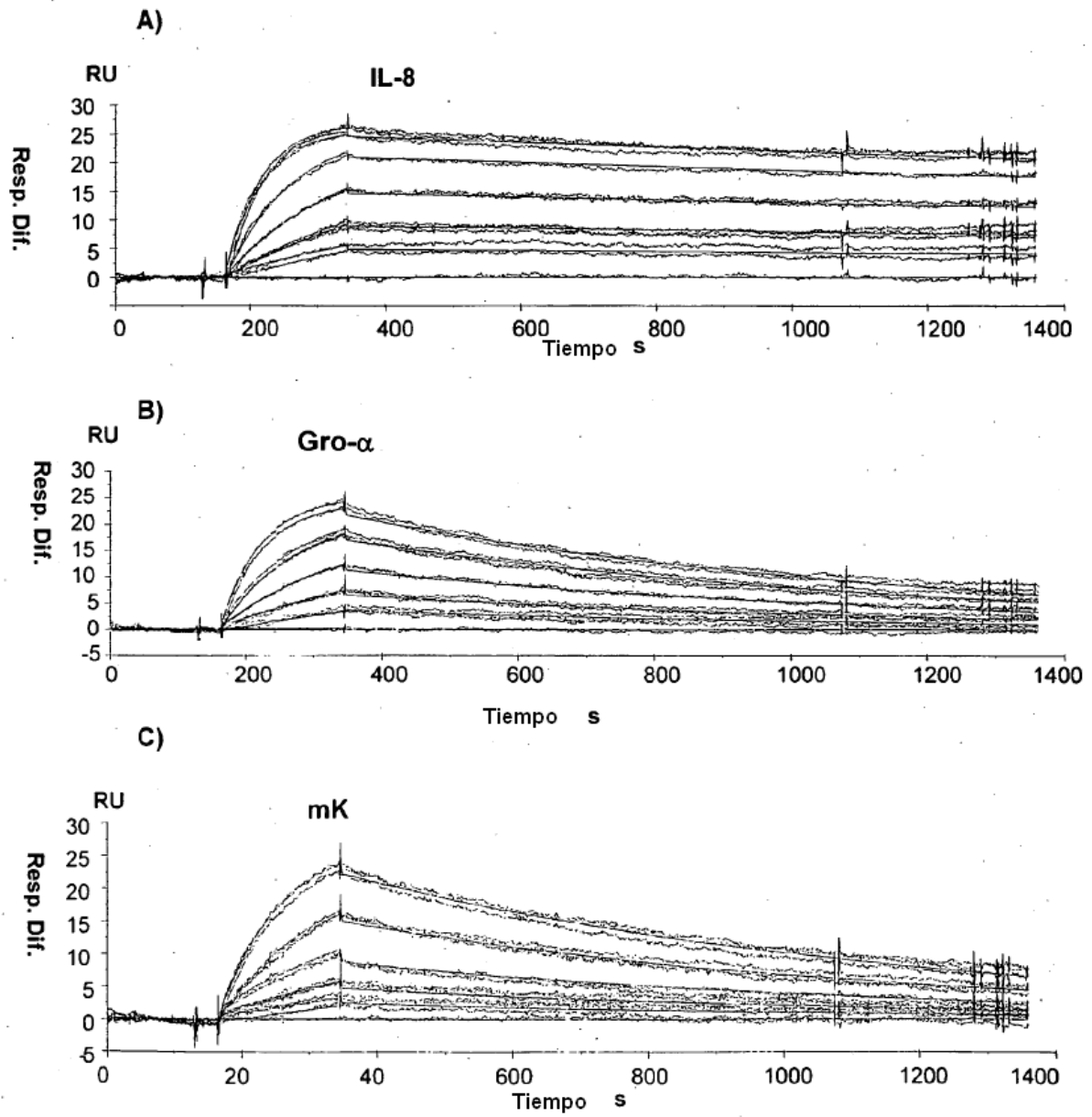


Fig. 15 continuación

D)

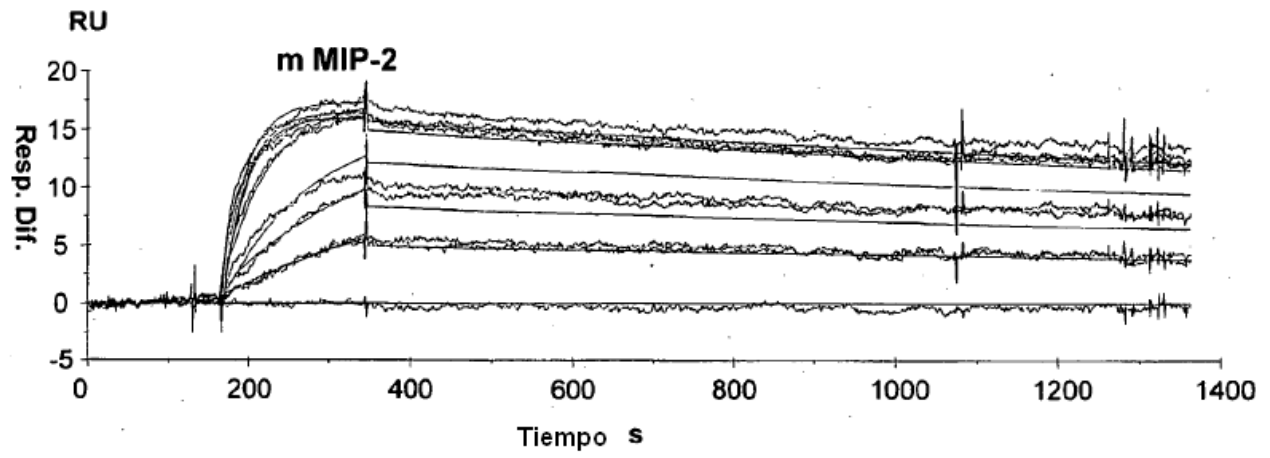


Fig. 16

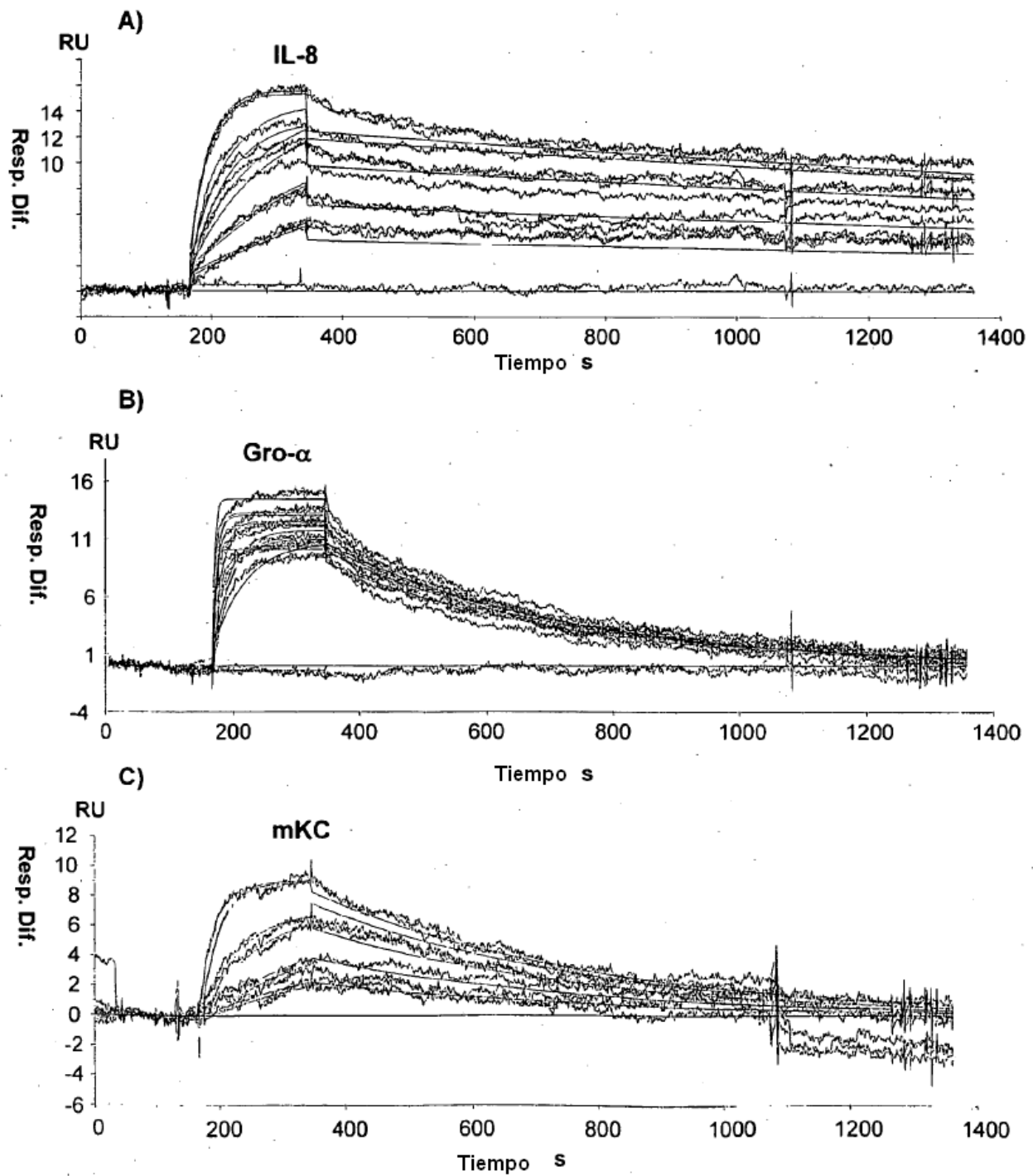


Fig. 16 continuación

D)

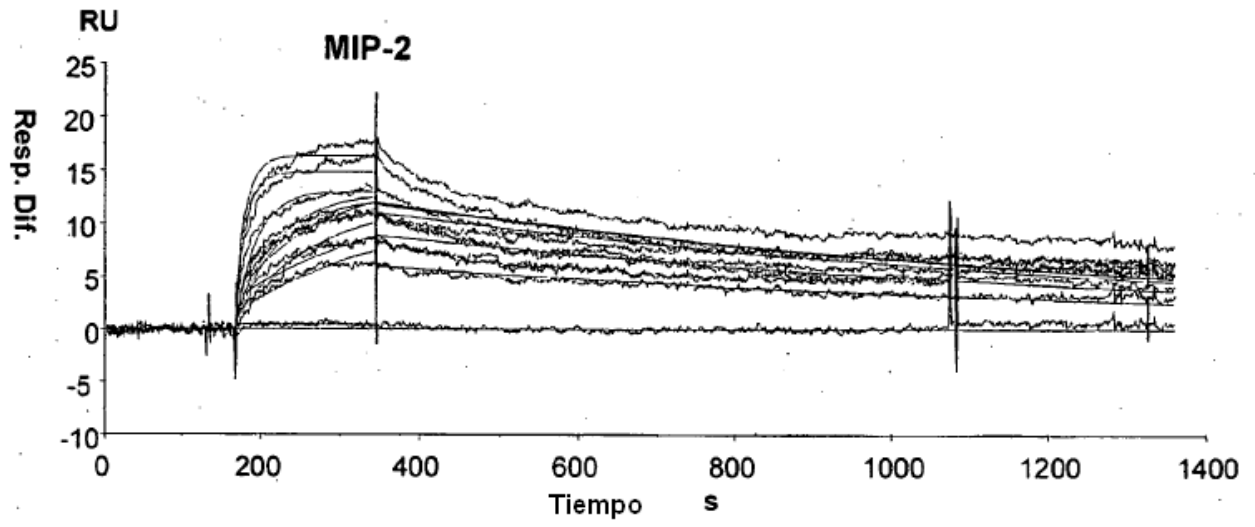


Fig. 17