



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0410876-0 B1



(22) Data do Depósito: 02/06/2004

(45) Data de Concessão: 03/11/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA DE FUSÃO, MOLÉCULA DE CDNA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PREPARAR UMA MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO, E, USOS DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO

(51) Int.Cl.: C07K 14/435.

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2003 GB 0312619.0; 25/11/2003 GB 0327386.9.

(73) Titular(es): VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA.

(72) Inventor(es): MILES ANDREW NUNN.

(86) Pedido PCT: PCT GB2004002341 de 02/06/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/106369 de 09/12/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/11/2005

(57) Resumo: MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO, ANTICORPO, PROTEÍNA DE FUSÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA PREPARAR UMA MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO OU UM SEU EQUIVALENTE FUNCIONAL OU UMA PROTEÍNA DE FUSÃO, PARA IDENTIFICAR UM LIGANDO DE UMA MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO, OU UM SEU EQUIVALENTE FUNCIONAL, PARA TRATAR UM ANIMAL QUE ESTEJA SOFRENDO DE UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO MEDIADOS PELO COMPLEMENTO, OU PREVENIR QUE UM ANIMAL DESENVOLVA UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO MEDIADOS PELO COMPLEMENTO, PARA VACINAR UM ANIMAL CONTRA UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO TRANSMITIDOS POR UM ARTRÓPODE HEMATÓFAGO E PARA INIBIR AS VIAS DO COMPLEMENTO CLÁSSICA E ALTERNATIVA EM UMA CÉLULA, TECIDO OU ORGANISMO NÃO HUMANO, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO, UMA PROTEÍNA DE FUSÃO OU UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO A invenção diz respeito a inibidores do complemento, que inibem tanto a via clássica quanto a alternativa do complemento. Em particular, a invenção diz respeito a inibidores do complemento derivados das glândulas salivares de artrópodes hematófagos que inibem tanto a via clássica quanto a alternativa do complemento. A invenção também diz respeito ao uso de tais inibidores do complemento no tratamento e prevenção de doenças.

“COMPOSIÇÃO, PROTEÍNA DE FUSÃO, MOLÉCULA DE CDNA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA PREPARAR UMA MOLÉCULA INIBIDORA DO COMPLEMENTO, E, USOS DE UMA COMPOSIÇÃO E DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO”

[0001] A presente invenção diz respeito a inibidores do complemento que inibem tanto a via clássica quanto a alternativa do complemento. Em particular, a invenção diz respeito a inibidores do complemento derivados das glândulas salivares de artrópodes hematófagos que inibem tanto a via clássica quanto a alternativa do complemento. A invenção também diz respeito ao uso de tais inibidores do complemento no tratamento e prevenção de doenças.

[0002] Todos os documentos mencionados no texto e listados no final deste relatório descritivo ficam nele incorporados como referência.

[0003] As proteínas do complemento formam o ramo principal do sistema imune efetor (Law e Reid, 1995; *Dodds and Sim*, 1997; Whaley, 1993). Mais do que 30 proteínas no soro e na superfície celular se acham envolvidas na função e regulação do sistema do complemento. O sistema é ativado pela presença de antígenos estranhos. Duas vias de ativação existem: (1) a via clássica, que é ativada pelos complexos de IgM e IgG ou pelo reconhecimento dos carboidratos; e (2) a via alternativa, que é ativada por superfícies não próprias (carentes de moléculas reguladoras específicas) e por endotoxinas bacterianas. As duas vias compreendem cascatas paralelas de eventos que resultam na produção de ativação do complemento através da formação de C3 e C5 convertases semelhantes sobre as superfícies celulares, resultando na liberação de mediadores agudos da inflamação (C3a e C5a) e na formação do complexo de ataque à membrana, como mostrado na Figura 1.

[0004] Os efeitos da ativação do complemento são de variação ampla e incluem: início da inflamação, especialmente através da liberação dos mediadores agudos C3a e C5a; opsonização e fagocitose de patógenos através

da deposição de C4b e C3b; depuração dos complexos celulares imunes pelo recrutamento de macrófagos; eficiência aumentada de apresentação da apresentação de antígeno aos receptores da célula B através da associação covalente de antígeno e C3d; retenção do antígeno nos centros germinais; absorção de antígeno intensificada pelas células que apresentam os antígenos; e rompimento de células estranhas ou desordenadas mediado pelo complexo de ataque à membrana (MAC) (por exemplo bactérias, parasitas, células tumorais).

[0005] A ativação do complemento deve ser firmemente controlada para prevenir dano aos tecidos próprios do corpo. O controle é mediado pelas meias-vidas curtas das proteínas ativadas, e pelas proteínas de controle presentes no plasma e sobre as membranas celulares. Quando o controle do complemento prossegue errado, o dano ao tecido corporal pode causar doença. Sahu e Lambris (2000) compilaram uma lista de 29 condições patológicas em que a falha à ativação do complemento de controle tem um papel. Elas incluem: pancreatite aguda, mal de Alzheimer, encefalomielite alérgica, alotransplantação, asma, síndrome da angústia respiratória adulta, lesões de queimaduras, doença de Crohn, glomerulonefrite, anemia hemolítica, hemodiálise, angioedema hereditário, lesões da reperfusão isquêmica, deficiência de órgão do sistema múltiplo, esclerose múltipla, miastenia grave, infarto miocárdico, psoríase, artrite reumatóide, choque séptico, lupus eritematoso sistêmico, acidente vascular cerebral, síndrome do vazamento vascular e xenotransplantação. Os dados derivados de modelos de animais (camundongos nocaute e transgênicos) demonstrando o papel essencial da ativação do complemento em algumas destas doenças foram examinados por Ward *et al.*, 2000.

[0006] O dano tecidual que se origina da ativação do complemento é mediado pelo MAC e pelas anafilatoxinas, C3a e C5a. Estes dois peptídeos induzem a dano através dos seus efeitos sobre os neutrófilos, eosinófilos,

macrófagos, células microgliais, basófilos e mastócitos. As células estimuladas pelas anafilatoxinas liberam mediadores pró-inflamatórios, enzimas de degradação tecidual, radicais livres de oxigênio e aumentam a aderência molecular e a expressão inflamatória da citocina (Ember *et al.*, 1998). Isto por sua vez leva à elaboração da resposta imune e à ativação dos mecanismos hemostáticos tais como a coagulação e a fibrinólise. O papel das anafilatoxinas nas doenças inflamatórias infecciosas e não infecciosas foi recentemente examinado por Kohl (2001). A atividade pró-inflamatória do MAC é principalmente mediada indiretamente pela indução da ativação celular causando expressão aumentada das moléculas de aderência, fator tecidual e quimiocinas.

[0007] Em vista da importância do controle do complemento no tratamento de doenças e distúrbios médicos, numerosos inibidores do complemento se acham em desenvolvimento para uso terapêutico (Tabela 1). Nenhum destes inibidores acha-se ainda disponíveis na clínica, não obstante alguns se achem correntemente em experiências clínicas de fase I/II. As moléculas inibidoras em desenvolvimento são inibidores naturais de elevado peso molecular (Hebell *et al.*, 1991; Weisman *et al.*, 1990) que são com frequência especificamente engendrados (Mulligan *et al.*, 1999; Smith e Smith, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Eles são geralmente anticorpos direcionados a componentes específicos do complemento (Frei *et al.*, 1987; Link *et al.*, 1999), moléculas pequenas incluindo os aptâmeros de RNA (Biesecker *et al.*, 1999) ou moléculas que especificamente alvejam os receptores do complemento.

TABELA 1 (de Sahu e Lambris, 2000): Inibidores do Complemento em desenvolvimento

Inibidor	Alvo
Proteína	
C1-Inh	C1
SCR1	C3b, C4b, C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b ₂ a, C4b ₃ b ₂ a
Vaccínia CCP	C3b, C4b, C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b ₂ a, C4b ₃ b ₂ a
SDAF	C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b ₂ a, C4b ₃ b ₂ a

SMCP	C3b, C4b
SMCP-DAF	C3b, C4b, C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b2a, C4b3b2a
SCD59	C5b – 8
DAF-CD59	C3b, C4b, C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b2a, C4b3b2a, C5b– 8
Mutantes C5a	C5aR
anticorpo anti-C5	C5
anticorpo anti-C3	C3
anticorpo Anti-C5a	C5a
anticorpo Anti-C3a	C3a
Molécula Pequena	
N MeFKPdChaWdR	C5aR
F-(OpdChaWR)C5aR	
Compstatina	C3
aptâmero de RNA	C5
BCX-1470	Fator D
FUT-175	Cls, Fator D, C3bBb, C3b ₂ Bb, C4b2a, C4b3b2a
K-76	C5
Inibidores de tioéster	C3, C4

[0008] Em vista da importância dos inibidores do complemento no tratamento de uma ampla faixa de doenças e condições, permanece a necessidade de inibidores adicionais do complemento.

Sumário da Invenção

[0009] Em conformidade com um primeiro aspecto da invenção, é fornecida uma molécula inibidora do complemento, que inibe tanto a via clássica quanto a alternativa de ativação do complemento.

[00010] Por “inibir” denota-se que o efeito das vias alternativa e clássica de ativação do complemento é reduzido. A capacidade de uma molécula de reduzir o efeito da via clássica do complemento e da via alternativa do complemento pode ser determinada por ensaios hemolíticos padrão conhecidos na técnica, tais como aqueles descritos nos Exemplos e em Giclas *et al.* (1994). Preferivelmente, a presença de uma molécula inibidora do complemento da invenção reduz a lise de glóbulos vermelhos nos ensaios hemolíticos padrão para as vias clássica e alternativa de ativação do complemento em pelo menos 20% em comparação com um ensaio padrão na ausência de uma molécula inibidora do complemento, mais preferível em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80%.

[00011] Preferivelmente, a molécula inibidora do complemento da

invenção inibe a clivagem de C5 pela C5 convertase na via clássica e pela C5 convertase na via alternativa. Como mostrado na Figura 1, a conversão de C5 em C5b pela C5 convertase ocorre tanto na via alternativa do complemento quanto na via clássica do complemento. A C5 convertase na via clássica é C4b3b2a e a C5 convertase na via alternativa é C3b₂Bb. A inibição da clivagem de C5 por ambas destas C5 convertases assim inibe tanto a via clássica quanto a via alternativa de ativação do complemento. A capacidade de uma molécula de inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica e alternativa pode ser determinada por ensaios padrão *in vitro*. Preferivelmente, a presença de uma molécula inibidora do complemento da invenção reduz a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica e alternativa em pelo 20% em comparação com um ensaio padrão na ausência de uma molécula inibidora do complemento, mais preferível em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80%. De preferência, as moléculas inibidoras do complemento da invenção são capazes de inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica e alternativa de uma faixa de espécies de mamíferos.

[00012] Em conformidade com um segundo aspecto da invenção, é fornecida uma molécula inibidora do complemento, a qual inibe a clivagem do C5 por uma C5 convertase. A molécula inibidora do complemento de acordo com este aspecto da invenção pode inibir a clivagem de C5 pela C5 convertase da via clássica de ativação do complemento. Alternativamente, a molécula inibidora do complemento deste aspecto da invenção pode inibir a clivagem de C5 pela C5 convertase da via alternativa de ativação do complemento. A capacidade de uma molécula de inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica ou alternativa pode ser determinada por ensaios padrão *in vitro* conforme descrito acima. Preferivelmente, a presença de uma molécula inibidora do complemento da invenção reduz a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica ou alternativa em pelo menos 20%

em comparação com um ensaio padrão na ausência de uma molécula inibidora do complemento, mais preferível em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70% ou 80%.

[00013] As moléculas inibidoras do complemento da invenção podem inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases da via clássica, da via alternativa ou de ambas as vias, a clássica e a alternativa, mediante ligação direta ou a C5 ou a qualquer uma, ou a ambas as C5 convertases. De preferência, as moléculas inibidoras do complemento da invenção inibem a clivagem de C5 pela ligação direta a C5. Alternativamente, as moléculas inibidoras do complemento podem inibir a clivagem de C5 pela ligação a um complexo de C5 e uma C5 convertase. A invenção ainda fornece uma molécula inibidora do complemento complexada com C5, complexada com uma C5 convertase, ou complexada tanto com C5 quanto com uma C5 convertase. A C5 convertase nestes complexos pode ser uma C5 convertase de qualquer das vias clássica ou alternativa.

[00014] Preferivelmente, as moléculas inibidoras do complemento são derivadas de um artrópode hematófago. A expressão “artrópode hematófago” inclui todos os artrópodes que tomam uma refeição de sangue de um hospedeiro adequado, tais como insetos, carrapatos, piolhos, pulas e ácaros.

[00015] O complemento é um dos primeiros sistemas de defesa imune encontrado pelos carrapatos sugadores de sangue quando eles tentam alimentar-se. Se os carrapatos ao se alimentar não assumem rápido controle da ativação do complemento, eles podem ser danificados pela resposta inflamatória do hospedeiro. Uma proteína de 18,5 kDa do carrapato *Ixodes scapularis* que inibe a via alternativa de ativação do complemento foi clonada e expressa (Valenzuela *et al.*, 2000). A atividade inibidora do complemento também foi descrita em *Dermacentor andersoni* (Ribeiro, 1987) e em extratos das glândulas salivares de *Ornithodoros moubata* (Astigarraga *et al.*, 1997), porém os componentes ativos não foram identificados. As moléculas que

inibem tanto a via alternativa quanto a clássica do complemento não haviam sido anteriormente identificadas nos carrapatos.

[00016] Quando a molécula inibidora do complemento da invenção é derivada de um artrópode hematófago, ela é preferivelmente derivada de um carrapato. De preferência, a molécula inibidora do complemento é derivada do carrapato *Ornithodoros moubata*.

[00017] Preferivelmente, a molécula inibidora do complemento derivada do *Ornithodoros moubata* é uma proteína compreendendo os aminoácidos 19 a 168 da sequência de aminoácidos da Figura 4, ou um seu equivalente funcional. Em particular, a molécula inibidora do complemento é uma proteína compreendendo os aminoácidos 1 a 168 da sequência de aminoácidos da Figura 4, ou seu equivalente funcional.

[00018] A proteína tendo a sequência de aminoácidos dada na Figura 4, também referida aqui como “proteína OmCI”, foi isolada das glândulas salivares do carrapato *Ornithodoros moubata* e foi observada inibir as vias clássica e alternativa do complemento. Mais particularmente, foi observado inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases de ambas as vias, clássica e alternativa, de ativação do complemento, alvejando a etapa de ativação de C5 sem afetar a ativação de C3. A proteína OmCI inibe a clivagem de C5 pelas C5 convertases em uma faixa de mamíferos. Os primeiros 18 aminoácidos da sequência de proteínas OmCI dada na Figura 4, formam uma sequência de sinal que não é necessária para a atividade inibidora do complemento. O termo “proteína OmCI”, como aqui usado, refere-se à sequência dada na Figura 4 com ou sem a sequência de sinal.

[00019] A expressão “equivalente funcional” é aqui usada para descrever homólogos e fragmentos da proteína OmCI que conserva a capacidade de inibir as vias clássica e alternativa do complemento. Preferivelmente, os equivalentes funcionais conservam a capacidade de inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases das vias clássica e alternativa. Os

equivalentes funcionais também incluem homólogos e fragmentos da proteína OmCI que conservam a capacidade de inibir a via clássica pela inibição da clivagem de C5 pela C5 convertase da via clássica ou que conservam a capacidade de inibir a via alternativa do complemento pela inibição da clivagem de C5 pela C5 convertase da via alternativa.

[00020] O termo “homólogo” intenta incluir referência a parólogos e ortólogos da sequência de OmCI que é explicitamente identificada na Figura 4, incluindo, por exemplo, a sequência de proteína OmCI de outras espécies de carrapato, incluindo a *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *A. americanum*, *A. cajennense*, *A. hebraeum*, *Boophilus microplus*, *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. andersoni*, *D. marginatus*, *D. variabilis*, *Haemaphysalis inermis*, *Ha. leachii*, *Ha. punctata*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hy. marginatum marginatum*, *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, *I. hexagonos*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *Ornithodoros erraticus*, *O. moubata moubata*, *O. m. porcinus* e *O. savignyi*. O termo “homólogo” denota também a inclusão da sequência de proteína OmCI da espécie de mosquito, incluindo aqueles dos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*, particularmente o *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*; espécies de pulgas, tais como *Ctenocephalides felis* (a pulga dos gatos); mutucas; mosquito-pólvora; borrachudos; moscas tsé-tsé; piolhos; ácaros; sanguessugas; e platielmintos.

[00021] Os métodos para a identificação de homólogos da sequência de OmCI dados na Figura 4 serão mais claros àqueles de habilidade na técnica. Por exemplo, os homólogos podem ser identificados mediante busca de homologia de bancos de dados de sequências, tanto públicos quanto privados. Convenientemente, os bancos de dados publicamente disponíveis podem ser usados, embora os bancos de dados privados ou comercialmente disponíveis sejam igualmente úteis, particularmente se eles contiverem dados não representados nos bancos de dados públicos. Os bancos de dados primários

são os sítios de depósito de seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos primários e podem estar pública ou comercialmente disponíveis. Exemplos de bancos de dados primários publicamente disponíveis incluem o banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o banco de dados de EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), o banco de dados de DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), o banco de dados de proteínas SWISS-PROT (<http://expasy.hcuge.ch/>), PIR (<http://pir.georgetown.edu/>), TrEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), o banco de dados TIGR (ver <http://www.tigr.org/tdb/index.html>), o banco de dados NRL-3D (<http://www.nbrfa.georgetown.edu>), o Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/pdb>), o banco de dados NRDB (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/nrdb/README>), o banco de dados OWL (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/OWL/>) e os bancos de dados secundários PROSITE (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>), PRINTS (<http://iupab.leeds.ac.uk/bmb5dp/prints.html>), Profiles (http://ulrec3.unil.ch/software/PFSCAN_form.html), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>), Identify (<http://dna.stanford.edu/identify/>) e Blocks (<http://www.blocks.fhcrc.org>). Exemplos de bancos de dados comercialmente disponíveis ou banco de dados privados incluem PathoGenome (Genome Therapeutics Inc.) e PathoSeq (Incyte Pharmaceuticals Inc.).

[00022] Tipicamente mais do que 30% de identidade entre dois polipeptídeos (preferivelmente através de uma região especificada) são considerados como sendo uma indicação de equivalência funcional e, assim, uma indicação de que duas proteínas são homólogas. Preferivelmente, as proteínas que são homólogas têm um grau de identidade de seqüência com a seqüência de proteínas OmCI identificada na Figura 4 de mais do que 60%. Homólogos mais preferidos têm graus de identidade de mais do que 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99%, respectivamente com a seqüência de proteínas

OmCI dada na Figura 4. O percentual de identidade, como aqui referido, é como determinado com o uso da versão BLAST 2.1.3 usando-se os parâmetros básicos especificados pelo NCBI (o National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosun 62 matrix; penalidade aberta de descontinuidade=11 e penalidade de extensão de descontinuidade=1].

[00023] Os homólogos da sequência de proteínas OmCI dada na Figura 4 incluem mutantes contendo substituições, inserções ou deleções de aminoácidos da sequência do tipo selvagem, contanto que a inibição das vias clássica ou alternativa do complemento demonstrada pela sequência de proteínas do tipo selvagem seja conservada. Preferivelmente, os mutantes conservam a capacidade de inibir tanto a via clássica com a alternativa do complemento. Preferivelmente, tais mutantes conservam a capacidade de inibir a clivagem de C5 pelas C5 convertases tanto da via alternativa quanto da clássica. Os mutantes que conservam a capacidade de inibir ou a via clássica ou a alternativa do complemento também são incluídos no termo homólogo, contanto que eles conservem a capacidade de inibir a clivagem de C5 ou pela C5 convertase da via alternativa ou pela C5 convertase da via clássica. Os mutantes, assim, incluem proteínas contendo substituições conservativas de aminoácido que não afetam a função ou a atividade da proteína de uma maneira adversa. Este termo intenta também incluir variantes biológicas naturais (por exemplo, variantes alélicas ou variações geográficas dentro das espécies das quais as proteínas OmCI são derivadas). Os mutantes com atividade aprimorada na inibição das vias clássicas ou alternativas em comparação com aquela da sequência de proteínas do tipo selvagem, podem ser projetados através da mutação sistemática ou direcionada de resíduos específicos na sequência de proteínas. De preferência, esses mutantes apresentam inibição melhorada da clivagem de C5 pela C5 convertase da via clássica ou pela Cr convertase das vias alternativas. Preferivelmente, estes

mutantes apresentam inibição melhorada da clivagem de C5 pelas C5 convertases tanto da via alternativa quanto da clássica.

[00024] Os fragmentos da proteína OmCI e dos homólogos da proteína OmCI, também são fornecidos pela invenção. Incluídos como tais fragmentos não são apenas os fragmentos da proteína OmCI de *O. moubata* que é explicitamente identificada neste relatório na Figura 4, mas também todos os fragmentos de homólogos desta proteína, como descrito acima. Esses fragmentos de homólogos possuirão tipicamente mais do que 60% de identidade com os fragmentos da sequência de proteínas OmCI da Figura 4, embora os fragmentos mais preferidos dos homólogos apresentem graus de identidade maiores do que 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99%, respectivamente com os fragmentos da sequência de proteínas OmCI da Figura 4. Os fragmentos da proteína OmCI compreendendo a sequência da Figura 4 e os fragmentos de seus homólogos, preferivelmente inibem as vias clássica e a alternativa do complemento, de preferência pela inibição da clivagem de C5 pelas C5 convertases tanto da via clássica quanto da alternativa. Os fragmentos da proteína OmCI e dos seus homólogos, que inibem ou a via clássica do complemento ou a via alternativa do complemento, são também incluídos na invenção, contanto que eles retenham a capacidade de inibir a clivagem de C5 ou pela C5 convertase da via clássica ou pela C5 convertase da via alternativa. Os fragmentos com atividade melhorada em inibir as vias clássicas ou alternativas do complemento e, em particular, a atividade melhorada em inibir a clivagem de C5 pela C5 convertase podem, naturalmente, ser racionalmente designados pela mutação sistemática ou fragmentação da sequência do tipo selvagem, seguidas por ensaios de atividade apropriados.

[00025] A expressão “equivalente funcional” também se refere a moléculas que são estruturalmente semelhantes à proteína OmCI ou que contêm estrutura terciária semelhante ou idêntica, particularmente no

ambiente do sítio ativo ou sítios ativos da OmCI. Julga-se que a OmCI iniba a clivagem de C5 pelas C5 convertases por ligação direta ou a C5 ou a ambas as C5 convertases, ou aos complexos de C5 com as C5 convertases. A OmCI é mostrada nos Exemplos neste relatório ligar-se a C5, apoiando a sugestão de que ela iniba a clivagem de C5 pelas C5 convertases mediante ligação direta a C5 apenas ou, quando C5 seja parte de um complexo com uma C5 convertase. Embora o requerente não deseje ficar ligado a esta teoria, postula-se que a ligação da OmCI a C5 possa impedir o acesso das C5 convertases ao sítio de clivagem de C5. Os equivalentes funcionais preferidos de OmCI, portanto, incluem moléculas, tais como homólogos e fragmentos, que retêm a capacidade de ligar-se diretamente a C5.

[00026] Acredita-se também que a OmCI seja um membro da família lipocalina de proteínas que ligam pequenos ligandos internamente. A OmCI pode, portanto, também inibir a clivagem de C5 e ou a deposição do MAC indiretamente, mediante ligação a um ligando pequeno que deva normalmente ligar-se a C5, a C5 convertase ou ao MAC, e que seja necessário para a função normal. Nenhum ligando pequeno foi descrito anteriormente como essencial para a função do sistema complemento, embora o componente gama C8 do MAC seja uma lipocalina que pode ligar-se a um ligando pequeno. Os equivalentes funcionais, assim, incluem moléculas que contêm estrutura terciária semelhante ou idêntica ao(s) sítio(s) ativo(s) na proteína OmCI que se liga a C5 ou a C5 convertases e/ou ao sítio ativo na proteína OmCI que liga um ligando pequeno. Em particular, as moléculas sintéticas que são delineadas para imitar a estrutura terciária ou o(s) sítio(s) ativo(s) da proteína OmCI são consideradas como sendo equivalentes funcionais.

[00027] A invenção ainda fornece a proteína OmCI, ou um seu fragmento ou um equivalente funcional, complexada com uma C5 convertase, ou complexada tanto com C5 quanto com C5 convertase. A C5 convertase nestes complexos pode ser uma C5 convertase ou da via clássica ou da via

alternativa.

[00028] Como examinado em mais detalhes anteriormente, existe uma necessidade contínua de inibidores de complemento e, em particular, de inibidores de complemento que inibam tanto a via clássica quanto a alternativa de ativação do complemento. As moléculas inibidoras do complemento da invenção, incluindo a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, terão uma ampla faixa de aplicações médicas, no tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças e condições, assim como serão ferramentas de pesquisas úteis no estudo da inibição do complemento e da inibição tanto da via alternativa quanto da clássica de ativação do complemento. A própria proteína OmCI será particularmente útil nestas aplicações, já que ela inibe a cascata de complemento de diversas espécies de mamíferos.

[00029] As moléculas inibidoras do complemento da invenção, incluindo a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, podem ser preparadas na forma recombinante por expressão em uma célula hospedeira. Tais métodos de expressão são bem conhecidos daqueles versados na técnica e são descritos em detalhes por Sambrook *et al.* (2000) e Fernandez & Hoeffler (1998). As proteínas e fragmentos da presente invenção também podem ser preparados com o uso de técnicas convencionais da química de proteínas. Por exemplo, os fragmentos protéicos podem ser preparados por síntese química.

[00030] Em conformidade com outra forma de realização, a invenção fornece um anticorpo que se liga a uma molécula inibidora do complemento como descrito acima. Em particular, a invenção fornece um anticorpo que se liga à proteína OmCI ou a um seu equivalente funcional. Anti-soros e anticorpos monoclonais podem ser produzidos por protocolos padrão com o uso de uma molécula inibidora do complemento, tal como a proteína OmCI ou seu equivalente funcional, como um imunógeno (ver, por exemplo,

Antibodies: A Laboratory Manual ed. por Harlow e Lane, Cold Spring Harbor Press, 1988). Como aqui usado, o termo anticorpo inclui fragmentos de anticorpos que também se liguem especificamente a uma molécula inibidora do complemento. O termo “anticorpo” ainda inclui moléculas de anticorpos quiméricos e humanizados tendo especificidade para uma molécula inibidora do complemento da invenção. Em alguns casos, será desejável ligar um grupo de rótulos ao anticorpo de modo a facilitar a detecção. Preferivelmente, o rótulo é uma enzima, um rótulo radioativo ou uma etiqueta fluorescente.

[00031] Os derivados das moléculas inibidoras do complemento descritas acima também se acham incluídos como formas de realização da invenção. Em particular, a invenção fornece derivados da proteína OmCI ou de seus equivalentes funcionais. Tais derivados incluem uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, que seja genética ou quimicamente fundida a um ou mais peptídeos ou polipeptídeos, A finalidade do peptídeo ou polipeptídeo adicionais pode ser auxiliar a detecção, a expressão, a separação ou a purificação da proteína, ou ele pode tomar emprestado as propriedades adicionais da proteína, como desejável. Exemplos de parceiros de fusão potenciais incluem a beta-galactosidase, glutathione-S-transferase, luciferase, uma etiqueta de poli-histidina, um fragmento da T7 polimerase e um peptídeo de sinal de secreção. Outros parceiros de fusão potencial incluem os biofármacos potenciais, tais como as proteínas que estejam sendo desenvolvidas para uso como medicamentos para tratar de doenças específicas.

[00032] A molécula inibidora do complemento pode também ser fundida a um domínio marcador. Preferivelmente, o domínio marcador é uma etiqueta fluorescente, uma etiqueta de epítipo que permita a purificação por ligação de afinidade, uma etiqueta enzimática que permita a rotulagem histoquímica ou fluorescente, ou uma etiqueta radioquímica. Em uma forma de realização preferida, o domínio marcador é uma etiqueta radioquímica.

[00033] Os métodos para a geração de proteínas de fusão são padrão na técnica e serão conhecidos do leitor habilitado. Por exemplo, a biologia molecular mais geral, a tecnologia de DNA recombinante da microbiologia, e as técnicas imunológicas, podem ser encontradas em Sambrook *et al.* (2000) ou em Ausubel *et al.* (1991). Geralmente, as proteínas de fusão podem ser o mais convenientemente geradas recombinantemente a partir das moléculas de ácido nucleico em que duas seqüências de ácido nucleico estejam fundidas entre si em matriz. Estas proteínas de fusão serão codificadas por moléculas de ácido nucleico que contenham a seqüência codificadora relevante da proteína de fusão em questão.

[00034] De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecida uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando uma molécula inibidora do complemento de acordo com os aspectos acima descritos da invenção. Tais moléculas incluem DNA, cDNA e RNA de filamento único ou duplo, bem como espécies de ácido nucleico sintéticas. Preferivelmente, as seqüências de ácido nucleico compreendem DNA.

[00035] Preferivelmente, a molécula de ácido nucleico compreende uma seqüência de nucleotídeos codificando a proteína OmCI ou um seu equivalente funcional. Preferivelmente, uma tal molécula de ácido nucleico compreende as bases de 55 a 507 da seqüência de nucleotídeos da Figura 4. As primeiras 54 bases da seqüência de nucleotídeos da Figura 4 codificam a seqüência de sinal da OmCI, a qual não é necessária para a atividade inibidora do complemento. A invenção também fornece uma molécula de ácido nucleico compreendendo as bases de 1 a 507 da seqüência de ácido nucleico da Figura 4, a qual codifica a proteína OmCI com a seqüência de sinal. Como aqui usada, a expressão “moléculas de ácido nucleico codificando a proteína OmCI” inclui ambas as moléculas de ácido nucleico codificando a proteína OmCI com as moléculas de ácido nucleico da seqüência de sinal codificando

a proteína OmCI sem a sequência de sinal.

[00036] A invenção também inclui a clonagem e a expressão de vetores compreendendo as moléculas de ácido nucleico deste aspecto da invenção. Tais vetores de expressão podem incorporar as sequências de controle transcricionais e translacionais apropriadas, por exemplo elementos intensificadores, regiões de promotor-operador, sequências de parada de terminação, sequências de estabilidade do mRNA, códons de partida e de parada, ou sítios de ligação ribossômica, ligados em matriz com as moléculas de ácido nucleico da invenção.

[00037] Adicionalmente, pode ser conveniente fazer com que uma proteína recombinante seja secretada de certos hospedeiros. conseqüentemente, outros componentes de tais vetores podem incluir sequências de ácido nucleico codificando a secreção, sinalização e sequências de processamento.

[00038] Os vetores de acordo com a invenção incluem plasmídeos e vírus (incluindo tanto os vírus bacteriófagos quanto os eucarióticos), bem como outros veículos de DNA lineares ou circulares, tais como aqueles que empregam elementos transponíveis ou tecnologia de recombinação homóloga. Muitos de tais vetores e sistemas de expressão são conhecidos e documentados na técnica (Fernandez & Hoeffler, 1998). Vetores virais particularmente adequados incluem os vetores com base nos baculovírus, adenovírus e nos vírus da vacínia.

[00039] Hospedeiros adequados para expressão recombinante incluem espécies procarióticas comumente usadas, tais como *E. coli*, ou leveduras eucarióticas que podem ser produzidas para expressar altos níveis de proteínas recombinantes e que podem facilmente ser cultivadas em grandes quantidades. Preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula de levedura eucariótica. As linhagens celulares de mamíferos crescidas *in vitro* também são adequadas, particularmente quando do uso de sistemas de expressão

conduzidos por vírus. Outro sistema de expressão adequado é o sistema de expressão de baculovírus que envolve o uso de células de inseto como hospedeiros. Um sistema de expressão também pode constituir células hospedeiras que tenham o DNA incorporado em seu genoma. As proteínas, ou fragmentos de proteínas, também podem ser expressas *in vivo*, por exemplo nas larvas de insetos ou nos tecidos de mamíferos.

[00040] Uma variedade de técnicas pode ser usada para introduzir os vetores de acordo com a presente invenção em células procarióticas ou eucarióticas. Técnicas adequadas de transformação ou de transfecção são bem descritas na literatura (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1991; Spector, Goldman & Leinwald, 1998). Nas células eucarióticas, os sistemas de expressão podem ou ser transientes (por exemplo, epissômico) ou permanente (integração cromossômica) de acordo com as necessidades do sistema.

[00041] A invenção também provê moléculas de ácido nucleico anti-sentido, que hibridizam sob condições de hibridização de alta estringência às moléculas de ácido nucleico codificando as moléculas inibidoras do complemento. Em particular, a invenção provê moléculas de ácido nucleico anti-sentido que hibridizam sob condições de hibridização de alta estringência a moléculas de ácido nucleico codificando a proteína OmCI. As condições de hibridização de alta estringência são aqui definidas como incubação noturna a 42°C em uma solução compreendendo 50% de formamida, 5XSSC (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), 5x solução de Denhardts, 10% de sulfato de dextrano e 20 micrograma/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, cisalhado, seguido por lavagem dos filtros em 0,1X SSC aproximadamente a 65°C.

[00042] Em uma forma de realização preferida, um rótulo capaz de ser detectado é ligado a estas moléculas de ácido nucleico anti-sentido. De preferência, o rótulo é selecionado do grupo consistindo de radioisótopos, compostos fluorescentes e enzimas.

[00043] A invenção também inclui células hospedeiras transfectadas procarióticas ou eucarióticas compreendendo uma molécula de ácido nucleico, uma molécula de ácido nucleico anti-sentido ou um vetor como definido acima. Quando as células hospedeiras sejam células procarióticas, elas preferivelmente são células de *E. coli*.

[00044] A invenção também provê um método para preparar uma molécula inibidora do complemento, conforme definido acima, que compreende cultivar uma célula hospedeira contendo uma molécula de ácido nucleico em conformidade com a invenção, sob condições pelas quais a proteína seja expressa, e recuperando-se a proteína assim produzida. Preferivelmente, a célula hospedeira é uma célula de levedura.

[00045] Como examinado acima quanto aos equivalentes funcionais, acredita-se que a OmCI seja um membro da família de proteínas da lipocalina e que possa exercer parte de seu efeito mediante ligação a um ligando pequeno não identificado. Outras moléculas inibidoras do complemento da invenção e seus equivalentes funcionais podem também exercer seus efeitos inibidores das vias de ativação do complemento, mediante a ligação a ligandos pequenos. A identificação destes ligandos de ocorrência natural é desejável, já que eles podem, por si mesmos, atuar como agonistas ou como antagonistas das vias clássica e/ou alternativa de ativação do complemento. Tais ligandos de ocorrência natural podem, eles próprios, ser úteis no tratamento de doenças associadas com a ativação das vias do complemento anormalmente elevada ou baixa, ou podem ser pontos de partida úteis para o desenvolvimento de ligandos sintéticos para o tratamento de tais doenças. Alternativamente, os ligandos de ocorrência natural podem ser alvos úteis para o desenvolvimento de moléculas inibidoras adicionais do complemento, que a eles se ligam. De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecido um método de identificar um ligando de uma molécula inibidora do complemento ou um seu equivalente funcional, como descrito anteriormente,

compreendendo as etapas de: (a) colocar em contato a molécula inibidora do complemento ou seu equivalente funcional com um ligando candidato; e (b) detectar a formação de um complexo de moléculas inibidoras de ligando-complemento.

[00046] Qualquer ligando candidato pode ser usado neste método. O ligando candidato pode ser isolado, por exemplo, das células, das preparações livres de células, de bibliotecas químicas ou de misturas do produto natural. Uma vez os ligandos de ocorrência natural das moléculas inibidoras do complemento tenham sido identificadas, pode ser desejável projetar moléculas sintéticas pequenas que imitem a estrutura terciária dos ligandos de ocorrência natural. A capacidade de tais moléculas sintéticas de ligarem-se às moléculas inibidoras do complemento também pode ser testada com o uso do método da invenção.

[00047] A molécula inibidora do complemento que é usada neste método pode estar livre na solução, afixada a um suporte sólido, carregada sobre uma superfície celular ou localizada intracelularmente. Por exemplo, a molécula inibidora do complemento pode ser afixada a um suporte sólido, com o ligando candidato sendo adicionado subsequente. Alternativamente, um ou mais ligandos candidatos podem ser afixados a um suporte sólido e colocados em contato com a molécula inibidora do complemento.

[00048] A etapa de detectar a formação de um complexo entre o ligando candidato e a molécula inibidora do complemento pode ser realizada por meio de um rótulo direta ou indiretamente associado com o ligando candidato ou em um ensaio envolvendo competição com um competidor rotulado. Em outra forma de realização, podem ser usados ensaios de triagem competitiva, em que os anticorpos neutralizantes que são capazes de ligar a molécula inibidora do complemento, especificamente competem com um ligando candidato para ligação. Desta maneira, os anticorpos podem ser

usados para detectar a presença de qualquer composto de teste que possua afinidade de ligação específica quanto ao polipeptídeo.

[00049] O método da invenção pode empregar técnicas de triagem de alta produção conhecidas na prática, para examinar ligandos candidatos múltiplos simultaneamente quanto à capacidade de se ligarem a uma molécula inibidora do complemento. Por exemplo, a WO 84/03564 apresenta grandes números de sintetização de diferentes ligandos candidatos sobre um substrato sólido, os quais podem então ser reagidos com a molécula inibidora do complemento da invenção e lavados. Quer ou não a molécula inibidora do complemento se tenha ligado aos ligandos candidatos, pode então ser detectado com o uso de métodos bem conhecidos na técnica.

[00050] A invenção também fornece um ligando de uma molécula inibidora do complemento identificada ou identificável pelos métodos descritos acima. Quando a molécula inibidora do complemento seja uma proteína OmCI ou um seu equivalente funcional, postula-se que o ligando possa ser uma molécula pequena que se ligue a C5 ou a uma C5 convertase ou a um componente do MAC.

[00051] De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecida uma composição compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando uma molécula inibidora do complemento, ou um ligando de uma molécula inibidora do complemento, de acordo com os aspectos da invenção acima descritos, em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável. Em particular, é fornecida uma composição compreendendo uma proteína OmCI ou um seu equivalente funcional, uma proteína de fusão compreendendo uma proteína OmCI ou um seu equivalente funcional, uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando uma proteína OmCI ou um seu equivalente

funcional, ou um ligando de uma proteína OmCI ou um seu equivalente funcional em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00052] A expressão “veículo farmacêuticamente aceitável”, como aqui usada, inclui genes, polipeptídeos, anticorpos, lipossomas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e partículas virais inativas ou de fato qualquer outro agente fornecido que o próprio excipiente não induza efeitos de toxicidade nem cause a produção de anticorpos que sejam nocivos ao indivíduo que receba a composição farmacêutica. Veículos farmacêuticamente aceitáveis podem adicionalmente conter líquidos tais como água, solução salina, glicerol, etanol ou substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, substâncias de tamponamento do pH e outros. Excipientes podem possibilitar que as composições farmacêuticas sejam formuladas em tabletes, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões, para auxiliar a ingestão pelo paciente. Um exame completo dos veículos farmacêuticamente aceitáveis acha-se disponível em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

[00053] A composição pode ser usada como uma composição de vacina e pode, assim, opcionalmente compreender um agente imunoestimulante, por exemplo um adjuvante. De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a formulação de uma composição de vacina compreendendo dispor uma molécula inibidora do complemento de acordo com os aspectos da invenção acima descritos, tal como uma proteína OmCI ou um seu equivalente funcional, em associação com um veículo farmacêuticamente aceitável, opcionalmente com um adjuvante. Adjuvantes adequados são bem conhecidos na técnica e incluem as formulações em emulsão óleo-em-água, adjuvantes de saponina, Adjuvante de Freund Completo (CFA) e Adjuvante de Freund Incompleto (IFA) e outras substâncias que atuem como agentes imunoestimulantes para intensificar a eficácia da composição.

[00054] Em conformidade com um outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando uma molécula inibidora do complemento, ou um ligando de uma molécula inibidora do complemento, conforme descrito acima, para uso em terapia.

[00055] A invenção também fornece um método de tratar de um animal que esteja sofrendo de uma doença ou distúrbio mediados pelo complemento ou prevenir o desenvolvimento em um animal de uma doença ou distúrbio mediados pelo complemento, compreendendo administrar ao referido animal uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando uma molécula inibidora do complemento, um ligando de uma molécula inibidora do complemento, ou uma composição farmacêutica de acordo com os aspectos da invenção acima descritos, em uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz.

[00056] Preferivelmente, referido animal é um mamífero, mais preferível um ser humano.

[00057] A expressão “quantidade terapeuticamente eficaz” refere-se à quantidade de composto necessária para tratar ou melhorar uma doença ou condição alvo. A expressão “quantidade profilaticamente eficaz” aqui usada refere-se à quantidade de composto necessária para prevenir uma doença ou condição alvo. A dosagem exata em geral dependerá do estado do paciente no momento da administração. Fatores que podem ser levados em consideração quando se determinar a dosagem incluem a gravidade do estado da doença no paciente, a saúde geral do paciente, a idade, o peso, o sexo, a dieta, o tempo e a frequência de administração, as combinações de medicamentos, as sensibilidades de reação e a tolerância ou resposta do paciente à terapia. A

quantidade precisa pode ser determinada por experimentação de rotina, mas pode finalmente ficar sob o julgamento do clínico. Geralmente, uma dose eficaz será de 0,1 mg/kg (massa de medicamento comparada com a massa do paciente) a 50 mg/kg, preferível de 0,05 mg/kg a 10 mg/kg. As composições podem ser administradas individualmente a um paciente ou podem ser administradas em combinação com outros agentes, medicamentos ou hormônios.

[00058] A invenção também fornece o uso de uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando uma molécula inibidora do complemento, ou um ligando de uma molécula inibidora do complemento de acordo com a invenção na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou um distúrbio mediados pelo complemento.

[00059] As moléculas inibidoras do complemento da invenção e, em particular, a proteína OmCI e os seus equivalentes funcionais, têm usos clínicos potenciais no tratamento de todas as condições patológicas em que o complemento desempenhe um papel (Sahu e Lambris, 2000).

[00060] Moléculas inibidoras do complemento preferidas de acordo com a invenção, tais como a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, inibem as vias clássica e alternativa do complemento através da inibição da clivagem de C5 pelas C5 convertases tanto da via clássica quanto da via alternativa. A inibição específica da clivagem de C5 por ambas as C5 convertases bloqueia todas as três vias de ativação do complemento levando à geração de C5a e MAC, mas preserva as funções de depuração imune e de opsonização do complemento, o que depende de C3b. Um tal perfil pode ser útil para a intervenção terapêutica em certas doenças tais como a Mal de Alzheimer, a artrite reumatóide, a glomerulonefrite e os distúrbios de hipersensibilidade tipo retardado (Kohl, 2001).

[00061] Por exemplo, em um modelo de camundongo do mal de Alzheimer (AD), que é associado com a inflamação cerebral proeminente (que pode ser parcialmente mediada pelo complemento), a inibição de C3 aumentou a taxa de deposição de placas beta-amilóides (Wyss-Coray *et al.*, 2002). Portanto, a inibição de C5, mas não de C3, pode ser benéfica no tratamento da AD.

[00062] A pesquisa dentro do papel das C5 convertases revela que as moléculas inibidoras do complemento da invenção, que inibem a clivagem de C5 pelas C5 convertases, tais como a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, serão úteis também no tratamento de uma ampla variedade de outras doenças e distúrbios. Uma vez que nenhum inibidor natural das C5 convertases foi relatado, os pesquisadores têm até agora objetivado esta etapa pelo desenvolvimento de anticorpos anti-C5 inibidores, aptâmeros de RNA inibidores e peptídeos sintéticos que objetivam o receptor C5a (reexaminado em Sahu e Lambris, 2000). Estudos anteriores, com o uso do mAb BB5.1 anti-C5 (Frei *et al.*, 1987), estabeleceram claramente o papel patológico do C5a e do MAC em vários modelos de doenças, incluindo a nefrite complexa imune (Wang *et al.*, 1996), a artrite induzida pelo colágeno (Wang *et al.*, 1995), a isquemia miocárdica e reperfusão (Vakeva *et al.*, 1998) e pacientes com desvio cardiopulmonar (Rollins *et al.*, 1998). O mAB anti-C5 (18A10) foi mostrado melhorar a sobrevivência do enxerto neural (Cicchetti *et al.*, 2002).

[00063] As moléculas inibidoras do complemento da invenção, que inibem as vias clássica e alternativa do complemento pela inibição da clivagem de C5 pelas C5 convertases de ambas as vias, tais como a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, serão portando de uso no tratamento destas doenças e distúrbios em três áreas chaves: (1) controle de doenças autoimunes tais como a artrite reumatóide; (2) redução do dano tecidual devido ao complemento seguido por cirurgia; e (3) supressão da rejeição tecidual particularmente no campo de transplante de órgão transgênico.

[00064] A patologia das doenças autoimunes tais como a artrite reumatóide e a glomerulonefrites tem muitos fatores causais. A via clássica de ativação do complemento tem um papel em ambas as doenças, por causa da presença de auto-anticorpos que resultam em complexos imunes de anticorpo-antígeno de IgG e IgA dentro do fluido sinovial e dos glomérulos (Daha, 1993) que causam ativação inadequada do complemento e dano tecidual. A super-expressão do Crry solúvel (homólogo de camundongo CR1) protege os camundongos transgênicos contra a insuficiência renal aguda induzida por anticorpos (Schiller *et al.*, 2001). Os complexos imunes da artrite reumatóide são complicados pela presença de fatores reumatóides IgM, os quais podem impedir a inibição mediada pelo complemento da precipitação imune (Jarvis *et al.*, 1993) e pela proteção reduzida das células sinoviais contra os efeitos celulares e a lise mediada pelo MAC (Kontinnen, 1996). O C5, atuando através da via alternativa do complemento parece ter um papel crucial no modelo de murinos K/BxN da artrite reumatóide (Solomon *et al.*, 2002). As moléculas inibidoras do complemento da invenção, tais como a proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, serão, assim, úteis no tratamento destas doenças autoimunes.

[00065] A ativação do complemento causa decréscimos na função miocárdica, e pressão de reperfusão coronária e taxas de fluxo linfático aumentadas. Muitas destas mudanças podem ser mediadas pelo MAC (Homeister, 1992). A proteína CR1 solúvel produzida pela tecnologia de DNA recombinante é eficaz em inibir a ativação do complemento e as conseqüentes atividades inflamatórias em um modelo de rato de lesão de reperfusão da isquemia miocárdica transiente (Weisman *et al.*, 1990). O Crry reduz a lesão da reperfusão da isquemia aos intestinos de camundongos (Rehrig *et al.*, 2001). Em seres humanos, a inibição do C5 pelo anticorpo humanizado de cadeia única h5G1.1-ScFV atenua significativamente a lesão miocárdica pós-operatória, os déficits cognitivos e a perda de sangue em

pacientes que se estejam submetendo a desvio cardiopulmonar (Fitch *et al.*, 1999). As moléculas inibidoras do complemento da invenção, que inibem a atividade das C5 convertases das vias clássica e alternativa, serão assim úteis na prevenção e tratamento das lesões miocárdicas pós-operatórias, tais como as lesões de reperfusão.

[00066] Existe um interesse contínuo nos inibidores clássicos e alternativos do complemento, os quais podem ser eficazes na rejeição de órgãos de aloenxertos e xenoenxertos hiperagudos (coração e fígado) (Diamond *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996; Pratt *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996; Fiorante *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2002). A principal barreira imunológica ao xenotransplante entre o homem e o porco é um rápido processo de rejeição mediado por anticorpos e complemento naturais pré-formados, isto é, por ativação da via clássica. Os enxertos de órgãos xenogênicos são especialmente suscetíveis à lesão mediada pelo complemento, porque as proteínas reguladoras do complemento, que normalmente protegem as células contra a lesão, funcionam fracamente na regulação do complemento heterólogo. As moléculas inibidoras do complemento da invenção, assim, serão úteis na prevenção da rejeição de transplantes. A proteína OmCI e os seus equivalentes funcionais serão particularmente úteis na prevenção da rejeição de transplantes, uma vez que a proteína OmCI inibe as C5 convertases de uma ampla faixa de espécies de mamíferos (roedores e primatas examinados até hoje).

[00067] A anafilotoxina, C5a, que é produzida durante a conversão de C5 em C5 convertases, tem sido apresentado como envolvido na sépsis, nas doenças de complexos imunes e na hipersensibilidade tipo retardado. A proteína OmCI e seus equivalentes funcionais, bem como outras proteínas inibidoras do complemento da invenção, que inibem as C5 convertases, serão úteis no tratamento destes distúrbios. A proteína OmCI e seus equivalentes funcionais puderam comprovar serem úteis como uma terapia adjuvante

durante o xenotransplante mediante impedimento da formação de C5a e deposição de parada do MAC que pode causar a supra-regulação do fator tecidual e a expressão da P-selectina em modelos de transplantes de animais (Fecke *et al.*, 2002).

[00068] Outros usos específicos possíveis incluem: (1) a prevenção da ativação de plaquetas pelo complemento durante a armazenagem de concentrados de plaquetas (Miletic e Popovic, 1993), (2) ativação do complemento pelas superfícies biomateriais durante a transfusão de sangue, (3) tratamento de fertilidade (Bedford e Witkin, 1983) e (4) proteção de vetores retrovirais da terapia de genes contra a lise por anticorpos e complemento naturais durante a terapia de genes (Rollins *et al.*, 1996).

[00069] Os artrópodes hematófagos, tais como os carrapatos, são extremamente eficazes como transmissores de doença. Convencionalmente, as técnicas para controlar as populações de carrapatos têm usado o tratamento dos animais com produtos químicos tais como os acaricidas. Esta estratégia tem resultado no desenvolvimento de carrapatos resistentes, significando que novas classes de produtos químicos devem ser introduzidas. Além disso, os produtos químicos têm pouco efeito residual, significando que eles devem ser aplicados freqüentemente. Uma segunda abordagem é criar animais resistentes ao carrapato, porém o grau de resistência que resulta está longe do ideal.

[00070] Em um esforço para combater as doenças transmitidas por parasitas, várias tentativas têm sido feitas para imunizar os animais contra carrapatos com o uso de extratos de carrapatos completos ou de intestino de carrapato. Certos relatos têm usado proteínas recombinantes de carrapato (ver, por exemplo, o pedido de patente internacional WO 88/03929). No entanto, a despeito de tais desenvolvimentos, as únicas vacinas de carrapato comercialmente disponíveis são ativas apenas contra o estágio adulto dos carrapatos *B. microplus* e apresentam variação na eficácia, dependendo da

localização geográfica desta espécie.

[00071] De acordo ainda com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para vacinar um animal contra uma doença ou distúrbio transmitidos por um artrópode hematófago, compreendendo administrar ao referido animal uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, uma molécula de ácido nucleico codificando uma molécula inibidora do complemento, ou uma composição de acordo com os aspectos acima descritos da invenção.

[00072] Candidatos adequados para vacinação incluem seres humanos e animais domesticados, tais como o gado bovino, cabras, carneiros, cães, gatos e outros animais que requerem proteção contra os artrópodes hematófagos, especialmente carrapatos, e as infecções que eles transmitem. A vacina pode ser administrada isoladamente, ou em combinação com outros imunógenos. O método deste aspecto da invenção pode ser usado para vacinar o animal contra qualquer doença ou distúrbio transmitidos pelo artrópode hematófago. Preferivelmente, o artrópode hematófago é um carrapato, preferivelmente o *O. moubata*. As doenças e distúrbios transmitidos pelos carrapatos do gênero *Ornithodoros* incluem a febre recorrente (Borreliose) e o vírus do Nilo Ocidental no homem, e o vírus da febre suína africana em porcos.

[00073] A invenção ainda inclui o uso de uma molécula inibidora do complemento de acordo com os aspectos da invenção acima descritos, como uma ferramenta de diagnóstico. A identificação das moléculas inibidoras do complemento da invenção possibilitará que os pesquisadores estudem os efeitos da inibição simultânea das vias do complemento, tanto clássica quanto alternativa. Em particular, a identificação da proteína OmCI capacitará os pesquisadores a estudar os efeitos da inibição simultânea das vias do complemento, tanto a clássica quanto a alternativa, através da inibição da C5

convertase.

A invenção também fornece um método para inibir as vias clássica e alternativa do complemento em uma célula, tecido ou organismo não humano, compreendendo administrar à referida célula, tecido ou organismo uma molécula inibidora do complemento, uma proteína de fusão compreendendo uma molécula inibidora do complemento, ou uma molécula de ácido nucleico codificando a molécula inibidora do complemento, de acordo com os aspectos da invenção acima descritos. Em particular, a invenção fornece um método para inibir a atividade da C5 convertase em uma célula, tecido ou organismo não humano, compreendendo administrar à referida célula, tecido ou organismo uma proteína OmCI ou seu equivalente funcional, uma proteína de fusão compreendendo uma proteína OmCI ou seu equivalente funcional, ou uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína OmCI ou seu equivalente funcional. Este método permitirá que os pesquisadores elucidem o papel do C5 em várias doenças e distúrbios. Por exemplo, foi sugerido que Cr pode desempenhar um papel positivo na prevenção da asma (Kohl, 2001). Os inibidores da C5 convertase da invenção podem ser usados para determinar se esse é o caso.

[00074] Vários aspectos e formas de realização da presente invenção serão agora descritos em mais detalhes por meio de exemplo. Observar-se-á que a modificação dos detalhes pode ser feita sem que se afaste do escopo da invenção.

Breve Descrição das Figuras

[00075] Figura 1: Diagrama esquemático das vias clássica e alternativa da ativação do complemento. Componentes enzimáticos, cinza escuro. Anafilatoxinas incluídas em estrelas explodidas.

[00076] Figura 2: Purificação do inibidor do complemento de *O. moubata* (OmCI). a. Cromatografia de troca de cátions. Pico contendo inibidor indicado pela flecha. b. Ensaio hemolítico clássico Amostra 1 (barra

negra), 100% de lise; amostra 2, 0% de lise; amostra 3, (barra hachurada) apenas soro; amostra 4, soro mais 1 µl de SGE; amostras 5 a 23 (barras cinzas) soro mais as frações 10 a 28 de 10 µl mostradas no painel a. Média de 3 repetições.

[00077] Figura 3: Análise da OmCI purificada por a. SDS-PAGE desnaturante, b. focalização isoeletrica (IEF) e c. cromatografia líquida de alta pressão (HPLV). As frações f15 e f17 nos painéis a. e b. são as mesmas. A fração f15 foi recuperada e analisada por HPLC, painel c. Os marcadores de tamanho e os marcadores de ponto isoeletrico (PI) são indicados à esquerda dos painéis a. e b.

[00078] Figura 4: Seqüência primária de OmCI. Seqüência de sinal sublinhada. Resíduos de cisteína no tipo negrito. O número de nucleotídeos e de aminoácidos indicados à direita.

[00079] Figura 5: Alinhamento da seqüência Clustal X de OmCI com as proteínas 2 e 3 da glândula salivar de carrapato (TSGP2 e 3) e moubatin. Os resíduos idênticos são realçados em cinza (cisteínas em negro) e com asteriscos.

[00080] Figura 6: Atividade inibidora em a. sobrenadante e b. pelota celular de clones de levedura com OmCI introduzida no genoma (13,1 a 13,5), e clone com vetor apenas introduzido no genoma (controle).

[00081] Figura 7: Expressão (a) e desglicosilação (b) de rOmCI expresso em célula de levedura. a. SDS PAGE das frações 9 a 13 da coluna de filtração de gel Superdex-75. b. Efeito do tratamento de PNGaseF sobre a mobilidade do rOmCI altamente glicosilado (frações 9 a 11 no painel a). As flechas indicam PNGaseF (flecha superior) e OmCI nativa (flecha inferior). EV504 é de forma distante relacionado a OmCI e é conhecido como sendo glicosilado. Os marcadores de tamanho (kDa) indicados à esquerda do painel.

[00082] Figura 8: Inibição da lise causada pelas vias clássica (CH50) e alternativa (AH50) de ativação do complemento por concentrações diferentes

da OmCI nativa. Média de 4 repetições.

[00083] Figura 9: Efeito da OmCI sobre a adição de C8 e C9 ao complexo de ataque à membrana (MAC) parcialmente formado. Absorbância devida a 100% e 0% de lise e na ausência (PBS) e presença (SGE) de inibidor mostrada. Média de 6 repetições.

[00084] Figura 10: Decurso de tempo mostrando a ausência do efeito da OmCI sobre a clivagem de C3a de C3 α da via clássica analisada por a. SDS-PAGE desnaturante e b. imunomanchamento com anti-soro específico de C3a. a. Minutos (min) desde a partida da reação indicada. Reações realizadas com (OmCI) ou sem (PBS) inibidor, ou na presença de EDTA 10 mM. As posições da albumina de soro bovino (BSA) e da hemoglobina (HAE) mostradas. Os marcadores de tamanho (kDa) indicados à esquerda do painel. b. Como o painel a., posições de C3a e C3 α mostradas.

[00085] Figura 11: Efeito da OmCI sobre a clivagem de C5 convertase clássica, alternativa e do fator de veneno de cobra (CVF), de C5a do C5 α analisado por ELISA. Picogramas/ μ l de C5a liberado medido após 100% de lise de glóbulos vermelhos de carneiro com água, 0% de lise em GVB²⁺ apenas, e reações com (OmCI) ou sem (PBS) inibidor. Média de 4 repetições.

[00086] Figura 12: Efeito da adição de C3 e C5 puro a C3 e C5 exauridos de soro na lise da via clássica de glóbulos vermelhos de carneiro (+) e na ausência (-) de quantidade mínima de OmCI que deu completa inibição de lise em um excesso duplo de 1 log. Média de 4 repetições.

[00087] Figura 13: Efeito da ebulição sobre a atividade inibidora da OmCI no ensaio de CH50.

[00088] Figura 14: Efeito do tratamento do pH sobre a atividade inibidora da OmCI no ensaio de CH50.

[00089] Figura 15: Detecção da ligação de C5 a nOmCI. nOmCI e RaHBP2 (controle) transferido para nitrocelulose foram sondados com C3 ou C5 rotulado de ¹²⁵I, depois auto-radiografados. Marcadores de tamanho

protéico (kDa) indicados à esquerda do painel.

[00090] Figura 16: Detecção da ligação de nOmCI ao C5 por cromatografia de filtração em gel. nOmCI radio-rotulado a. com ou sem C3 e C5 purificado (C3/C5 puros) e b. com ou sem NHS, e C3 e C5 exauridos de soro (delta C3/C5). Marcadores do tamanho protéico (kDa) indicado por flechas.

Exemplos

Materiais e Métodos

Materiais

[00091] Os glóbulos vermelhos de carneiro e de coelho foram do Tissue Culture Services. A hemolisina, o soro humano normal agrupado (NHS) e o soro exaurido foram todos obtidos da Sigma. Os soros de porquinho-da-índia foram de animais domésticos. C3, C4, C5, C8 e C9 puros e os fatores B e D, foram comprados da Calbiochem. Os anti-soros policlonais de coelho C3a anti-humano foram da Calbiochem, e o fator de veneno de cobra (CVF), da Quidel. O kit de detecção de ELISA C5a foi comprado da Immuno-Biological Laboratories (IBL).

Carrapatos

Carrapatos *Ornithodoros moubata* foram criados de acordo com Jones *et al.* (1988).

Preparação e purificação da amostra de glândulas salivares

[00092] As glândulas salivares foram dissecadas sob um microscópio, lavadas brevemente em tampão de PBS frio (tampão de fosfato 0,01M e NaCl 0,15M pH 7,2) e transferidas para frascos de Eppendorf permanecendo em gelo seco e armazenadas congeladas a -20°C. Quando necessário, 30 pares de glândulas salivares eram descongelados e rompidas em 500 µl de PBS com o uso de um homogeneizador Dounce de 1 ml. O homogeneizado foi centrifugado em 15K RPM em uma centrífuga de topo de bancada e o sobrenadante (referido como extrato de glândulas salivares, SGE) foi coletado

e armazenado a -70°C , ou testado quanto à atividade inibidora do complemento e usado para isolamento da fração ativa.

Via clássica do ensaio hemolítico do complemento (CH50)

[00093] Cinco ml de sangue de carneiro fresco em solução de Alsever (1:1 vol/vol) foram lavados uma vez em 50 ml de barbitol veronal de gelatina-EDTA (GVB-EDTA) e três vezes em 50 ml de tampão de GVB²⁺ (tampão de GVB com Mg²⁺ e Ca²⁺). O sangue foi diluído até uma concentração de 1×10^9 células ml⁻¹. Os eritrócitos foram sensibilizados com o uso de hemolisina de coelho, titulados como descrito (Coligan, 1994). Os ensaios foram realizados em um volume total de 200 µl com o uso de 100 µl 1:40 de NHS diluído ou soro de porquinho-da-índia em GVB²⁺ como uma fonte do complemento e 100 µl 2×10^8 de eritrócitos sensibilizados (EA) de acordo com protocolos padrão (Giclas, 1994). SGE, OmCI nativa ou recombinante (nOmCI ou rOmCI) ou PBS (1 a 5 µl) foi adicionado por último, e as reações foram incubadas a 37°C . No final do decurso de tempo (até 32 minutos) as células completas foram centrifugadas a $12000 \times g$ por 5 segundos e a hemólise medida espectrofotometricamente a 412 nm (Coligan, 1994). Todos os ensaios foram realizados pelo menos três vezes.

Via alternativa do ensaio hemolítico do complemento (AH50)

[00094] Cinco ml de sangue de coelho fresco em solução de Alsever (1:1 vol/vol) foram lavados três vezes em 50 ml de tampão GVB/Mg (10 mM) EGTA por centrifugação a $1500 \times g$ por 10 minutos entre as lavagens. O sangue de coelho foi diluído até 2×10^8 células ml⁻¹. NHS foi diluído em tampão de GVB/Mg EGTA. O volume do ensaio foi composto a 150 µl com 50 µl de sangue preparado. 1 a 5 µl de SGE, PBS, OmCI nativa ou OmCI recombinante foram adicionados à reação por último, e as reações foram incubadas a 37°C . No final do decurso de tempo (até 60 minutos) as células completas foram centrifugadas a $12000 \times g$ por 5 segundos e a hemólise medida espectrofotometricamente a 412 nm (Coligan, 1994). Todos os

ensaios foram realizados pelo menos três vezes.

Ensaio lítico usando soros exauridos em componentes específicos do complemento

[00095] Soros humanos exauridos foram usados de acordo com as instruções do fabricante, mas o volume total de cada reação foi reduzido a 200 µl. Os volumes e diluições dos componentes puros do complemento que dão 90% de lise, foram determinados empiricamente. As reações foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Todos os ensaios foram realizados pelo menos três vezes.

Purificação do inibidor do complemento de O. moubata (OmCI) de SGE

[00096] 150 µl de SGE foram diluídos em 5 ml de tampão de fosfato de sódio 25 mM, pH 6,8, NaCl 50 mM, e carregados em uma coluna de troca de cátions Q-Sepharose HP (Pharmacia) em uma taxa de fluxo de 1 ml/min. Após a lavagem com uma outra coluna de 10 volumes de tampão de desenvolvimento, as proteínas ligadas foram eluídas usando-se um gradiente de NaCl 0,05 a 0,75M de 40 minutos em uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min e monitoradas em 280 nm. Frações de um ml foram coletadas e 10 µl foram ensaiados quanto à atividade inibidora do complemento em ensaios de CH50 de volume total de 200 µl. Frações representativas ativas e inativas foram concentradas até 50 µl, com o uso de 3 dispositivos de filtração (Amicon), 2 ml de PBS foram adicionados, as frações foram concentradas a 50 µl novamente e 1,5 µl de cada foi desenvolvido em um gel de SDS desnaturante de Tris-Tricina 4 a 12% (Invitrogen). Cinco µl por faixa tanto de frações ativas quanto inativas foram desenvolvidos em um gel de IEF de pH 3 a 7 (Invitrogen) e eletromanchados a Immobilon®-P (Millipore) usando 0,7% de ácido acético. A membrana foi manchada com Ponceau-S, e as bandas principais excisadas e eluídas em 200 µl de Tris 50 mM pH 8, Triton-X100 2% mediante turbilhonamento por 1 min e centrifugação por 10 minutos a 15K rpm por três vezes; O Triton-X100 foi removido por repurificação das

proteínas em colunas Q-Sepharose HP usando-se as condições descritas acima. Após a concentração de Centricon 3 e troca de tampão por PBS, as amostras foram ensaiadas quanto à atividade inibidora do complemento e examinadas sobre 4 a 12% de géis ou submetidas a fracionamento de HPLC e análise de sequência protéica.

Deteção da produção de C3a durante ensaios hemolíticos

[00097] Ensaios de CH50/AH50 foram estabelecidos em um volume total de 200 µl usando uma diluição final a 1:80 de NHS ou soro de porquinho-da-índia com ou sem OmCI nativa. As reações colocadas a 37°C foram removidas do banho de água em pontos do tempo especificados, depois centrifugadas a 12000 g por 10 segundos, e o sobrenadante foi removido para análise subsequente por imunomanchamento. 10 µl de cada amostra de sobrenadante reduzida foram submetidos a eletroforese em 4 a 12% de gel Bis-Tris desenvolvido com tampão de desenvolvimento MES (Invitrogen), depois transferidos para nitrocelulose. A confirmação de igual carga e mesmo a transferência para todas as faixas foram julgadas pela intensidade da banda de albumina de soro em seguida ao manchamento de Ponceau. A clivagem do C3a do C3 foi detectada por imunomanchamento com o uso de anti-soro monoespecífico de coelho de C3a anti-humano (Calbiochem). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada durante a noite com solução salina tamponada de fosfato, 0,1% de Tween 20, 5% de leite em pó desnatado (PBSTM). Este tampão foi usado para todas as diluições e etapas de lavagem subsequentes a menos que de outra forma indicado. Os anti-soros anti-C3a foram diluídos a 1:500 e incubados com a membrana por 2 horas. A membrana foi então lavada por duas vezes por 20 minutos antes da adição a 1:300 da diluição do conjugado de fosfatase alcalina anti-coelho (Sigma) em PBSTM. Após outras 2 horas de incubação, a membrana foi lavada por duas vezes por 5 minutos, enxaguada brevemente em água e foram adicionados 10 ml de substrato de fosfatase alcalina líquida púrpura BCIP/NBT (Sigma).

Detecção da produção de C5a durante os ensaios hemolíticos

[00098] Ensaios hemolíticos foram realizados como descrito para a detecção do C3a. Um kit ELISA de C5a (IBL) foi usado para detectar a clivagem de C5a do C5. Para impedir a reação cruzada com C5 não clivado, o C5 presente no sobrenadante dos ensaios hemolíticos foi precipitado com o uso do reagente fornecido pelos fabricantes do kit. A faixa de medição do kit se estende de 0,1 a 10 µg/litro. O limite inferior de detecção é de 0,02 µg/l.

Descomplementação do soro com o fator de veneno de cobra (CVF)

[00099] 0,25 µg de CVF (0,25 µg/µl de estoque) e ou 1 µl de OmCI nativa ou 1 µl de PBS foram adicionados a 5 µl de soro humano e incubados por 1 hora a 37°C. Metade do soro tratado com CVF foi adicionada a 97,5 µl de GVB²⁺ e 100 µl de EA. Após a incubação por 20 minutos a 37°C, o percentual de lise e a concentração de C5a (ver acima) nos sobrenadantes da reação foram determinados.

HPLC de fração ativa, análise da seqüência protéica e digestão trípica

[000100] Vinte µl da fração ativa eluída da proteína resolvida por IEF foram desenvolvidos em uma coluna C4 Jupiter/150 x 1,0 mm, e um gradiente de 10 a 40% de acetonitrila (ACN) com ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA), taxa de fluxo de 1 ml/min. com incrementos de 0,5% de ACN/min, e monitorados a 215 nm. quatro picos de desenvolvimento fechados em c.53 min foram transferidos para a membrana Immobilon-P e seqüenciados usando-se um cartucho Mini-Blott da Applied Biosystems. Vinte e cinco ciclos foram realizados sobre cada proteína.

[000101] Quanto à análise de seqüência dos produtos de digestão trípica, o pico principal em 53 min (compreendendo todos os quatro picos observados na primeira separação de HPLC) foi secado em uma SpeedVac e redissolvido em guanidina 6M Tris 0,5M pH 8,0, depois reduzido e alquilado com o uso de 4-vinilpiridina. Foi então desenvolvido novamente na mesma coluna C4 Jupiter. Nenhuma mudança no tempo de retenção foi observada. O

pico principal foi secado em SpeedVac e redissolvido em bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,1. Dez µl de tripsina imobilizada Pierce foram adicionados e a mistura foi incubada a 37°C por 5 horas com mistura intermitente. A mistura foi então centrifugada a 10K rpm e o sobrenadante foi carregado em uma HPLC de micromanchamento 173a (coluna Aquapore C18/100 x 0,5 mm). Os picos de interesse foram excisados da membrana e seqüenciados. Quinze ciclos foram realizados sobre cada proteína.

Construção da biblioteca de cDNA de O. moubata

[000102] Sessenta pares de glândulas salivares de *O. moubata* coletados das ninfas após sua 3ª e 4ª alimentação, foram excisados como descrito acima e colocados em 1 ml de RNAlater® (Ambion) (no lugar de PBS) e armazenados a -20°C. O mRNA foi isolado usando-se o kit de isolamento de mRNA FastTrack® 2,0 (Invitrogen) e o cDNA foi sintetizado usando-se um kit de síntese (Cat 200401-5). Após o fracionamento em cDNAs grandes e pequenos em uma coluna sefarose CL-2B, cada uma das pelotas de cDNA precipitadas em etanol foi recolocada em suspensão em 3,5 µl de ddH₂O. As produções de cDNA foram de aproximadamente 3,0 ng/µl e de 5 ng/µl para as moléculas grandes e pequenas, respectivamente. Todos os cDNAs grandes e pequenos remanescentes foram ligados no vetor fago UniZAP XR da Stratagene (Cat. 237211) e embalados com extrato de embalagem Gigapack® III Gold. Havia 22500 placas primárias na biblioteca de cDNA grande e 480500 placas primárias na biblioteca de cDNA pequena. Após a amplificação, os títulos das bibliotecas grande e pequena foram de $1,5 \times 10^8$ pfu x 10^8 pfu/ml e de 4×10^9 pfu/ml, respectivamente.

[000103] Vinte placas de cada biblioteca foram selecionadas em 0,5 ml de tampão SM (NaCl 0,1M, MgSO₄ 8 mM, TRIS 50 mM.HCl pH 7,5, 0.01% de gelatina), 1% de clorofórmio e eluídas de tampões de agarose por turbilhonamento. Os tamanhos dos insertos de fago foram examinados por PCR usando os iniciadores T7 (T7 5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG 3') e

T3 (5'AAT TAA CCC TCA CTA AAG 3'). Cada reação de 100 µl compreendia 2 µl de fago eluído, 2 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de cada iniciador (dos estoques de 0,5 µg/ml), 10 µl de 10X tampão de reação de PCR REDTaq (Sigma) (Tris 100 mM-HCl pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 11mM, 0,1% de gelatina), 3 µl de DNA polimerase REDTaq (Sigma) (1 unidade/µl em Tris 20 mM-HCl, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1mM, 0,5% de Tween 20, 0,5% de Igepal CA-630, corante inerte, 50% de glicerol) e 79 µl de ddH₂O. Os parâmetros de ciclagem térmica (ciclador térmico Hybaid Touchdown) foram 1X94°C 4min, 30X 94°C 1 min, 48,5°C 45 s, 72°C 90 s e 1X 72°C 5 min. A eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR mostraram que os insertos grandes da biblioteca foram ≥ 1000 pares de base e os insertos pequenos da biblioteca foram ≤ 1000 pares de base.

cDNA de clonagem codificando o inibidor do complemento

[000104] As seqüências N-terminais determinadas para os dois picos principais eluindo em 53 min do HPLC foram usadas para designar um iniciador degenerado (OF4) para uso com o iniciador T7 (que se liga ao vetor UniZAP XR), para amplificar o cDNA codificando o inibidor do complemento. A seqüência de OF4 foi 5' GTAC WSN GGN WSN GAR CCN GT 3' (em que: N = A ou C ou G ou T; R = G ou A; S = G ou C; e W = A ou T). A reação de 100 µl compreendeu 3 µl da biblioteca de cDNA grande ou pequeno, 3 µl de dNTPs 10mM, 2 µl de T7 e 4 µl de OF4 (do estoque de 0,5 µg/ml), 10 µl 10X o tampão de reação da PCR REDTaq, 3 µl de DNA polimerase REDTaq e 75 µl de dH₂O. Os parâmetros de ciclagem térmica foram de 1X 94°C 4 min, 30X 94°C 1 min, 48,5°C 45 s, 72°C 90 s, e 1X 72°C 5 min.

[000105] A eletroforese em gel de agarose revelou uma faixa de produtos da PCR. Dois produtos derivados do iniciador OF4 foram purificados com o uso de um kit de extração de gel Qiaex II (Qiagen) e seqüenciados com um kit de reação preparada de seqüenciamento do ciclo

terminador de corante ABI PRISM® e seqüenciador ABI (Perkin Elmer).

[000106] A tradução conceitual do produto de PCR maior (c.500 pares de base) e o mais intenso, derivados da biblioteca de cDNA pequeno usando o iniciador OF4 com T7, revelou uma comparação significativa de BlastX (Altschul *et al.*, 1997) com a seqüência C-terminal do inibidor da agregação de plaquetas de *O. moubata* moubatin (Waxman e Connolly, 1993). A seqüência estendeu-se além do códon de parada do cDNA codificando o peptídeo. O iniciador reverso (OR1 5' GGG AGG CTT TCT GTA TCC 3') comparando a região além do códon de parada foi usado com o iniciador T3 (que se liga do vetor UniZAP XR) para obter a extremidade 5' do cDNA. O produto da PCR de 650 pares de base foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) depois seqüenciado com o uso dos iniciadores adicionais OR3 5' CGT CCA ATC GGT TGA AG 3' e OF6 5' GAC TCG CAA AGT CAT CAC 3'.

Análise das Seqüências

[000107] As análises foram realizadas usando-se a série de programas do GCG (Wisconsin Package Version 10.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) e também o servidor proteômico ExPASy (Expert Protein Analysis System) do Swiss Institute of Bioinformatics (<http://expasy.hcuge.ch/>). As seqüências foram comparadas com o banco de dados de proteínas não redundante (NR) do GenBank usando o programa BlastX (Altschul *et al.*, 1997) e pesquisadas em relação aos domínios protéicos Pfam (Bateman *et al.*, 2000) e SMART (Schultz *et al.*, 2000). O alinhamento de seqüências múltiplas foi realizado com Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998).

Expressão e purificação de OmCI em leveduras

[000108] A região codificadora de OmCI foi amplificada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR; 95°C por 30", 50°C por 30", 72°C por 30"; 18 ciclos), com o uso do iniciador dianteiro OM1Y (5'-ATAGAGCTCAAATGCTGGTTTTGGTGACC-3') e os iniciadores

reversos OR7a (5' ACTGAGCGGCCGCCTAGTGATGGTGATGGTGATGACCGCAGTCCTTGAGATGGGG 3' para os produtos rotulados his) ou OR6 (5' ACT GAGCGGCCGCCTAGCAGTCCTTGAGATGGGG 3' produto não rotulado). Os iniciadores têm sítios de restrição embutidos, de tal modo que um sítio *Sac* I seja adicionado a montante do códon de partida e um sítio *Not* I a jusante do códon de parada. O produto foi ligado entre os sítios *Sac* I e *Not* I do vetor de transferência pMETa C (Invitrogen). O plasmídeo - amplificado em células XL1-Blue (Stratagene) - foi transformado nos pMAD16 e pMAD11 das cepas *Pichia methanolica* de acordo com as instruções do fornecedor (Invitrogen). Os clones positivos foram cultivados em Meio de complexo de Dextrose Tamponado BMDY, e a expressão protéica foi induzida em Meio de complexo de Metanol Tamponado. A expressão protéica no sobrenadante e nas células de 6 clones positivos, foi ensaiada a cada 24 horas por 5 dias mediante o ensaio lítico CH50.

[000109] Após 96 horas de incubação, 500 ml de meio celular de levedura foram centrifugados a 6370g por 15 minutos e o inibidor foi precipitado do sobrenadante pela adição de 30% (p/v) de PEG-8000 e agitação em gelo por 1 hora. Em seguida à centrifugação a 23700g por 1 hora, a pelota de proteína foi recolocada em suspensão em 50 ml de tampão de fosfato de sódio 25 mM pH 6,8, NaCl 50 mM, antes da centrifugação a 6.000 rpm para remover o material insolúvel. A solução depurada foi aplicada a uma coluna de troca de cátion Q-Sepharose HP de 1 ml e a atividade das frações inibidoras do complemento foi determinada conforme descrito acima. As frações ativas foram agrupadas e trocadas por 300 µl de PBS usando-se dispositivos de filtração Centricon 3 (Amicon), centrifugadas em 18900g por 10 minutos, depois aplicadas a uma coluna Superdex[®] 75 (Pharmacia) em uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min usando Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 200 mM como tampão de desenvolvimento. Frações de 0,5 ml foram monitoradas a 280 nm e coletadas por 30 minutos. 5 µl de cada fração foram ensaiados

quanto à atividade inibidora e as frações ativas trocadas por PBS antes da visualização pela desnaturação do SDS-PAGE.

[000110] rOmCI purificado foi tratado com N-glicosidase F peptídica (PNGaseF) de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). O rOmCI desglicosilado foi repurificado por filtração em gel como descrito acima. Cinco frações inibidoras foram identificadas por CH50 e 15 µl de cada foram desenvolvidos em SDS PAGE sob condições de desnaturação e de não desnaturação.

Termoestabilidade e estabilidade do pH do OmCI nativa

[000111] A quantidade mínima da OmCI nativa que inibe a lise celular mediada pela via clássica mediada por *c.*90% em uma diluição a 1:40 de soro de porquinho-da-índia foi determinada como sendo de 25 ng em um volume de reação total de 100 µl. Para examinar a termoestabilidade, 1 µl de OmCI nativa (250 ng) foi diluído em 9 µl de PBS. As amostras foram ebulidas por 0, 3, 9 ou 27 minutos, esfriadas rapidamente em gelo, e 1 µl (25 ng) foi adicionado a ensaios de CH50 de 100 µl (diluição de soro de porquinho-da-índia a 1:40). Para examinar a estabilidade do pH, 1 µl de OmCI nativa (250 ng) foi diluído em tampão de 9 µl de acetato de sódio 10 mM (pH 4,5 e 5,5), Tris 10 mM.Cl (pH 7 e 8,2) ou CAPS 10 mM (pH 10 e 11). Após a incubação por 30 minutos a 37°C, 1 µl (25 ng) foi adicionado a ensaios de CH50 de 100 µl (diluição de soro de porquinho-da-índia a 1:40). Os controles incluíram 1 µl de cada um dos tampões apenas na presença e na ausência de diluição de soro a 1:40. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Método para a detecção da ligação de C5 a OmCI

[000112] 0,5 µg de OmCI nativa e 5 µg de RaHBP2 foram submetidos a SDS-PAGE não desnaturante, depois transferido para nitrocelulose e bloqueado durante a noite em PBS, 0,05% de Tween 20, 5% de leite em pó desnatado (PBSTM). C3 e C5 foram rotulados com I¹²⁵ com o uso de Iodogen de acordo com as instruções do fabricante (Pierce). As manchas foram

incubadas com 2 µg de C3 rotulado de I¹²⁵ (1440 kcpm/min), e 2 µg de C5 rotulado de I¹²⁵ (2160 kcpm/min) em 15 ml de PBSTM por 4 horas em temperatura ambiente; Após lavagens de 3 x 20 min em PBSTM em temperatura ambiente, as membranas de nitrocelulose foram secadas e autoradiografadas.

[000113] Para a cromatografia de filtração em gel, 0,07 µg de OmCI rotulada de I¹²⁵ (1687 kcpm/min) foi incubado com 2 µg de C3 ou C5 puros, ou 23,8 µl de NHS ou soro exaurido de C3 ou C5. O PBS foi adicionado a um volume total de 100 µl e a mistura foi incubada por 10 minutos antes da cromatografia através de uma coluna Superose 12 10/30 em uma taxa de fluxo de 1 ml/min de PBS. Frações de 1 ml foram coletadas e o cpm foi medido na distância estabelecida de um contador Geiger portátil.

Resultados

Purificação e identificação de frações ativas de SGE

[000114] Em seguida à cromatografia de troca de cátions, a fração ativa eluída em NaCl 0,25M (Figuras 2a e b, flecha). A fração ativa e uma fração de controle (Figura 3a) foram eletrotransferidas de um gel de IEF (Figura 3b) para uma membrana de PVDF que havia sido manchada com Ponceau-S. As bandas principais foram excisadas, eluídas, repurificadas por cromatografia de troca de cátions e ensaiadas quanto à atividade inibidora do complemento. A desnaturação do SDS PAGE mostrou a atividade inibidora sendo associada com um triplo de proteínas com massas ao redor de 19 kDa (Figura 3a). A IEF mostrou a atividade inibidora como sendo associada com uma banda dominante única com um pI de aproximadamente 4,2 (Figura 3b, transporte da banda superior da fração 17). A HPLC da fração eluída de PVDF revelou quatro picos adjacentes (Figura 3c). Uma sequência N-terminal de 17 aminoácidos (DSESDXSGSEPVDFAFQA) obtida do pico maior (Figura 3c, pico D) foi usada para projetar os iniciadores degenerados que geraram um produto de PCR da biblioteca de cDNA de *O. moubata*, que combinou com a

seqüência N-terminal.

Estrutura primária do cDNA codificando OmCI

[000115] A seqüência do clone de comprimento completo mostra que a OmCI tem 168 aminoácidos de comprimento (Figura 4). A proteína tem um sinal de secreção N-terminal compreendendo os primeiros 18 resíduos. A análise da seqüência N-terminal indica que o sítio de clivagem do peptídeo de sinal está entre Ala18 e Asp19. O peso molecular previsto da proteína madura é de 16,77 kDa e o ponto isoelétrico de 4,3. Existem dois sítios de N-glicosilação previstos (Asn78 e Asn102) e doze sítios de fosforilação potencial (Ser 20, 22, 25, 84, 113, 115, 156, Thr90, Tyr17, 43, 111, 130, 162). Entretanto, tais sítios têm uma alta probabilidade de ocorrência (sítios de proteína cinase C, caseína cinase II e tirosina cinase) e uma predição do sítio pode não indicar necessariamente uma modificação genuína.

[000116] A seqüência primária da OmCI mostra 58% de identidade com as Proteínas de Glândulas Salivares de carrapato 2 e 3 (TSGP2 e 3) do carrapato mole *Ornithodoros savignyi* (Mans *et al.*, 2001), e 49% de identidade com o moubatin de *Ornithodoros moubata* (Waxman e Connolly, 1993). Todos os resíduos de cisteína e, portanto, presumivelmente o padrão de ligação em ponte de bissulfeto, são conservados nestas quatro proteínas (Figura 5). O alinhamento mostra que a OmCI tem duas inserções de aminoácidos curtas óbvias: SESD no término amino e PD cerca de dois terços do caminho através da seqüência do peptídeo maduro (Figura 5). A seqüência primária não tem uma comparação significativa com quaisquer outras seqüência nos bancos de dados públicos, incluindo a proteína anti-complemento de *scapulares* (Valenzuela *et al.*, 2000). Acredita-se que o moubatin e as TSGP2 e 3 sejam membros da família da lipocalina de proteínas formadoras de beta-tambor que incluem a família de proteínas de ligação da histamina das proteínas específicas do carrapato (Paesen *et al.*, 2000).

Expressão e purificação de (r) OmCI recombinante

[000117] Os 6 clones de levedura positivos ensaiados apresentaram níveis variáveis de expressão de OmCI (Figuras 6a e b). Em todos os casos em que a expressão havia sido detectada, a atividade inibidora continuamente aumentava através do ponto de ensaio final no dia 5. Aproximadamente 90% da proteína expressa estava no sobrenadante (Figura 6b). O clone 13.1 pareceu dar os níveis de expressão mais elevados e foi usado nos estudos de expressão subseqüentes. Em seguida à precipitação do PEG e às duas etapas de cromatografia, o rOmCI ativo parcialmente purificado se acha presente nas formas muito glicosiladas (Figura 7a, frações 9, 10 e 11) e não glicosiladas (Figura 7a, frações 12 e 13). A forma glicosilada mostrou-se corresponder à forma não glicosilada mediante tratamento com PNGaseF (Figura 7b). O rOmCI glicosilado e não glicosilado ou desglicosilado e a OmCI ativa são igualmente ativos nos ensaios de CH50 (dados não mostrados). A produção final do rOmCI foi de aproximadamente 0,3 µg/ml de meio.

Mecanismo de ação da OmCI

[000118] A OmCI inibe ambas as vias do complemento. Entretanto, embora a via clássica possa ser inteiramente inibida, mesmo a OmCI em excesso inibe a lise dos glóbulos vermelhos do sangue pela via alternativa em não mais do que 80% (Figura 8).

[000119] A OmCI não impede a incorporação de C8 e C9 nos C5b-7 ou C5b-8 pré-formados, respectivamente (Figura 9). Nem afeta a taxa de clivagem de C3α para produzir C3a ou pela via clássica ou pela alternativa (Figura 10). A OmCI não impede a produção de C5a de C5 por ambas as vias (Figura 11). O C5 puro excedente, mas não o C3, concorrem com o inibidor OmCI no ensaio hemolítico clássico (Figura 12). A OmCI não impede a descomplementação do soro por CVF (dados não mostrados). Nem impede a produção de C5a pela C3/C5 convertase de CVF (CVFBb) (Figura 11).

Termoestabilidade e estabilidade do pH da OmCI nativo

[000120] A ebulição da OmCI por até 9 minutos não tem um efeito significativo sobre a atividade inibidora da proteína, embora por 27 minutos a atividade inibidora tenha decrescido (Figura 13). A OmCI nativa ficou não afetada pela exposição aos tampões alcalinos até pH 11 (Figura 14). A exposição ao tampão de pH 4,5 marcadamente reduziu a atividade inibidora da OmCI (Figura 14). Os géis manchados de prata mostraram que isto não foi simplesmente por causa da precipitação da OmCI neste pH (dados não mostrados).

Deteção da ligação de C5 à OmCI

[000121] Western blotting com C3 e C5 rotulados de I¹²⁵ indica que a OmCI se liga diretamente ao C5, mas não à proteína C3 relacionada (Figura 15).

[000122] Evidência adicional de uma interação direta entre a OmCI e C5 foi obtida por cromatografia de filtração em gel. Um deslocamento de massa evidente em uma proporção do nOmCI rotulado de I¹²⁵ foi observado na presença de C5 purificado, mas não de C3 (Figura 16a). Um deslocamento de massa semelhante ficou evidente na presença de NHS e soro exaurido de C3, mas não de soro exaurido de C5 (Figura 16b). O deslocamento de massa foi mantido na presença de NaCl 1M, mas não de NaCl 2M, indicando uma forte interação eletrostática entre o inibidor e C5 (dados não mostrados).

Discussão

Relacionamento com outras proteínas e com inibidores do complemento conhecidos

[000123] OmCI é a mais intimamente relacionada às proteínas 2 e 3 das glândulas salivares de carrapato (TSGP2 e 3) do carrapato mole *O. savignyi* (Mans *et al.*, 2001) e a moubatin inibidor da agregação de plaquetas (Waxman e Connolly, 1993). Não foi mostrado, ou sugerido, que qualquer destas três proteínas (Figura 5) iniba o complemento. As duas inserções de aminoácido

pequenas presentes na OmCI, porém não nas proteínas intimamente relacionadas (Figura 5) são sítios óbvios a serem focalizados nos futuros estudos de mutagênese para definir os sítios de ligação do complemento na OmCI.

[000124] TSGP2 e 3 têm 95% de identidade de aminoácido e têm sido propostos para terem papéis na biogênese dos grânulos das glândulas salivares do carrapato (Mans *et al.*, 2001). A TSGP2 é tóxica para os camundongos; a TSGP3 não o é (Mans *et al.*, 2002). A OmCI é altamente improvável ser uma toxina, uma vez que *O. moubata* é não tóxica. (Astigarraga *et al.*, 1997) enquanto *O. savignyi* causa *tampan* (espécie de carrapato africano venenoso) de areia em uma ampla faixa de mamíferos (Mans *et al.*, 2002). Além disso, a inoculação de porquinhos-da-índia com 100 µg de OmCI nativa purificada, no processo de aumentar o anti-soro, não causou nenhum efeito fisiopatológico óbvio (observação pessoal).

[000125] A OmCI é provavelmente um membro da família de proteínas da lipocalina que inclui a família de proteínas de ligação da histamina de proteínas específicas do carrapato (Paesen *et al.*, 2000). As lipocalinas predominantemente ligam ligandos pequenos, hidrofóbicos, extracelulares dentro de suas estruturas de beta-tambor. Entretanto, a proteína de ligação da histamina do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* tem diferenças estruturais significativas da lipocalinas normais que permitem-nas ligar moléculas hidrófilas (Paesen *et al.*, 1999; Paesen *et al.*, 2000). Não se sabe ainda se a OmCI liga qualquer ligando pequeno.

[000126] A sequência primária da OmCI não tem nenhuma similaridade detectável aos domínios da proteína de controle do complemento (CCP) (repetições múltiplas de *c.*60 aminoácidos) que formam muitos dos inibidores dos corpos do próprio complemento incluindo os fatores H, C4BP, CR1, CR2, MCP e DAF). Nem é semelhante a quaisquer outros inibidores do complemento conhecidos nos bancos de dados públicos, incluindo Isac, a

proteína salivar do inibidor da via alternativa do complemento de *Ixodes scapularis* (Valenzuela *et al.*, 2000). Também não é relacionado à sequência N-terminal do antígeno 20A1 de *O. moubata* (Baranda *et al.*, 2000) que foi proposta como sendo o fator responsável pela inibição potente do complemento anteriormente observada nos SGE's de *O. moubata* e *O. erraticus* (Astigarraga *et al.*, 1997).

Mecanismo da Inibição do Complemento

[000127] Tanto rOmCI glicosilado quanto desglicosilado expressos na levedura são tão potentes quanto a proteína nativa purificada de SGE. A OmCI C-terminal rotulada histidina expressa em células de insetos não é tão potente (dados não mostrados). A OmCI inibe tanto a via clássica quanto a alternativa de ativação do complemento tanto de seres humanos quanto de porquinhos-da-índia e, presumivelmente, de outros mamíferos também. Esta propriedade deve comprovar ser útil em definir precisamente como a OmCI funciona, e será sem valor no desenvolvimento de modelos de animais de doenças mediadas pelo complemento em que a especificidade da espécie dos presentes inibidores de C5 tenha dificultado os estudos *in vivo* com o uso de roedores (Link *et al.*, 1999).

[000128] A OmCI não inibe nem a C3 convertase clássica (C4bC2a) nem a alternativa (C3bBb), uma vez que ela não tem nenhum efeito sobre a taxa de clivagem de C3 (Fig. 10). A OmCI não impede a produção de C5a (Fig. 11). Tendo em vista que o C5 em excesso compete, as C5 convertases funcionais clássica (C4bC2aC3b) e alternativa (C3b²Bb) do inibidor de OmCI (Figura 12) devem ser formadas na presença do inibidor do carrapato. A OmCI é improvável de ser um inibidor direto da serina protease dos componentes C2a e Bb catalíticos da convertase ou ela deve impedir a produção de C3a, assim como de C5a. O inibidor não impede a produção de C5a pela CVF C3/C5 convertase (CVFBb) (Fig. 11) que sugere que a OmCI não se ligue a C5 e bloqueie o sítio de clivagem de C5a. Esta última

descoberta não exclui a possibilidade de que a OmCI se ligue a um sítio em C5 que impeça a ligação às C5 convertases do soro normal, mas não a CVF convertase (Sandoval *et al.*, 2000).

[000129] Duas linhas independentes de evidência sugerem que a atividade da OmCI é mediada através da ligação direta a C5 (Fig. 15 e Fig. 16).

[000130] Não obstante a OmCI iniba ambas as vias do complemento, mesmo com inibidor em excesso, a via alternativa é inibida em no máximo 80% (Fig. 8). Isto é explicável em termos das diferentes C5 convertases usadas pelas vias clássica (C4bC2aC3b) e alternativa (C3b²Bb), mas o mecanismo permanece a ser explorado.

[000131] Em resumo, a OmCI provavelmente ou se liga a C5 e impede que interaja com as C5 convertases, ou se liga às C5 convertases e C5 e impede a clivagem de C5. Presentemente, não temos nenhuma evidência constrangedora apoiando uma possibilidade sobre a outra.

Termoestabilidade e estabilidade do pH da omci nativa

[000132] A OmCI é termoestável, mas a atividade começa a ser perdida após ser ebulida por 27 minutos. A OmCI parece ser sensível a ácido e insensível a álcali. Tanto a ebulição prolongada quanto a exposição a ácido provavelmente induzem a mudanças conformacionais que inativam a proteína.

Referências

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. E Lipman, D. J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

Astigarraga, A., Oleaga-Perez, A., Perez-Sanchez, R., Baranda, J. A., Encinas-Grandes, A. (1997). *Host immune response evasion strategies in Ornothodoros erraticus and O. moubata and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. Parasite Immunol.* 19, 401-410.

- Bao, L., Haas, M., Boackle, S. A., Kraus, D. M., Cunningham, P. N., Park, P., Alexander, J. J., Anderson, R. K., Culhane, K., Holers, V. M. e Quigg, R. J. (2002). *Transgenic expression of a soluble complement inhibitor protects against renal disease and promotes survival in MRL/pr mice. J. Immunol.* 168, 3601-3607.
- Baranda, J. A., Perez-Sanchez, R., Oleaga, A., Manzano, R., Encinas-Grandes, A. (2000). *Purification N-terminal sequencing and diagnostic value of the major antigens of Ornithodoros erraticus and O. moubata. Veterinary Parasit.* 87, 193-206.
- Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddt, S. R., Howe, K. L. e Sonnhammer, E. L. (2000). *The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res.* 28, 263-266.
- Bedford, J. M. e Witkin, S. M. (1983). *Influence of complement depletion on sperm function in the female rabbit. J. Reprod. Fertil.* 69, 523-528.
- Biesecker, G., Dihel, L., Enney, K., Bendele, R. A. (1999). *Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. Immunopharmacology* 42, 219-230.
- Cicchetti, F., Costantini, L., Belizaire, R., Burton, W., Isacson, O. e Fodor, W. (2002). *Combined inhibition of apoptosis and complement improves neural graft survival of embryonic rat and porcine mesencephalon in the rat brain. Exp. Neurol.* 177, 376-384.
- Coligan, J. E. (1994). *Complement. In "Current Protocols in Immunology".* (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marguiles, E. M. Shevach e W. Strober, Eds.). Wiley Interscience.
- Daha, M. R. (1993). Em *Complement in health and disease*, 2ª edição, (ed. K. Whaley), p 185. MTP, Lancaster.
- Diamond, L. E., McCurry, K. R., Oldham, E. R., Tone, M., Waldmann, H., Platt, J. L. e Logan, J. S. (1995). *Human CD59 expressed in transgenic mouse hearts inhibits the activation of complement. Transpl. Immunol.* 3, 305-312.

Dodds, A. W. e Sim, R. B. (1997). *Complement, The Practical Approach Series* (eds. da série D. Rickwood e B. D. Hames). Oxford University Press Inc., New York.

Ember, J. A., Jagels, M. A., Hugli, T. E. (1998). *Characterisation of complement anaphylatoxins and their biological responses*. Em: Volanakis, J. E., Frank, M. M. (Eds.), *The Human Complement System in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 241-284.

Fecke, W., Long, J., Richards, A., Harrison, R. (2002). *Protection of hDAF-transgenic porcine endothelial cells against activation by human complement: role of the membrane attack complex*. *Xenotransplantation* 9, 97-105.

Fernandez & Hoeffler (1998) *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Academic Press, San Diego, Londres, Boston, New York, Sydney, Tóquio, Toronto.

Fiorante, P., Banz, Y., Mohacsi, P. J., Kappeler, A., Wuillemin, W. A., Macchiarini, P., Roos, A., Daha, M. R., Schaffner, T., Haeberli, A., Mazmanian, G. M. e Rieben, R. (2001). *Low molecular weight dextran sulfate prevents complement activation and delays hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation models*. *Xenotransplantation* 8, 24-35.

Fitch, J. C., Rollins, S., Matis, L., Alford, B., Aranki, S., Collard, C. D., Dewar, M., Elefteriades, J., Hines, R., Kopf, G., Kraker, P., Li, L., O'Hara, R., Rinder, C., Shaw, R., Smith, B., Stahl, G. e Shernan, S. K. (1999). *Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanised, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass*. *Circulation*, 100, 2499-2506. Frei, Y., Lambris, J. D. e Stockinger, B. (1987). *Generation of a monoclonal antibody to mouse C5 application in an ELISA assay for detection of anti-C5 antibodies*. *Mol Cell. Probes* 1, 141-149.

Giclas, P. C. (1994). *Classical and alternative pathway evaluation (sections 13.1 and 13.2)*. In *Current Protocols in Immunology, Vol. 3, Complement*.

Editores: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marguiles, E. M. Shevach e W. Strober. Editor da série: R. Coico. John Wiley and Sons, Inc., USA.

Homeister, J. W., Satoh, P. e Lucchesi, B. R. (1992). *Effects of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components. Circ. Res.* 71, 303-319.

Hebell, T., Ahearn, J. M. e Fearon, D. T. (1991). *Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. Science*, 254, 102-105. Jarvis, J. N., Lockman, J. C. e Levine, R. P. (1993). *IgM rheumatoid factor and the inhibition of covalent binding of C4b to IgG in immune complexes. Clin. Exp. Rheumatol.* 11, 135-141.

Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. e Gibson, T. J. (1998). *Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem. Sci.* 23, 403-405.

Jones, L. D., Davies, C. R., Steele, G. M. e Nuttall, P. A. (1988). *The rearing and maintenance of ixodid and argasid ticks in the laboratory. Animal Technology* 39, 99-106.

Kohl, J. (2001). *Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. Molecular Immunology* 38, 175-187.

Kontinnen, Y. T., Ceponis, A., Meri, S., Vuorikoski, A., Kortekangas, P., Sorsa, T., Sukura, A. e Santavirta, S. (1996). *Complement in acute and chronic arthritides: assessment of C3c, C9, and protectin (CD59) in synovial membrane. Ann. Rheum. Dis.* 55, 888-894.

Kroshus, T. J., Salerno, C. T., Yeh, C. G., Higgins, P. J., Bolman, R. M. e Dalmaso, A. P. (2000). *A recombinant soluble chimeric complement inhibitor composed of human CD46 and CD55 reduces acute cardiac tissue injury in models of pig-to-human heart transplantation. Transplantation*, 69, 2282-2289.

Law, S. K. A. e Reid, K. B. M. (1995). *Complement*, Segunda edição, (ed. D. Male). Oxford University Press, Oxford.

- Link, C., Hawlisch, H., Meyer zu Vilsendorf, A., Gyleruz, S., Nagel, E. e Kohl, J. (1999). *Selection of phage-displayed anti-guinea pig C5 or C5a antibodies and their application in xenotransplantation. Mol. Immunol.* 36, 1235-1247.
- Mans, B. J., Venter, J. D., Very, P. J., Louw, A. I., Neitz, A. W. (2001). *Identification of putative proteins involved in granule biogenesis of tick salivary glands. Electrophoresis*, 22, 1739-1746.
- Mans, B. J., Steinmann, C. M. L., Venter, J. D., Louw, A. I. e Neitz, A. W. H. (2002). *Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, Ornithodoros savignyi. Toxicon* 40, 1007-1016.
- Miletic, V. D. e Popovic, O. (1993). *Complement activation in stored platelet concentrates. Transfusion* 33, 150-154.
- Mulligan, M. S., Warner, R. L., Rittershaus, C. W., Thomas, L. J., Ryan, U. S., Foreman, K. E., Crouch, L. D., Till, G. O. e Ward, P. A. (1999). *Endothelial targeting and enhanced anti-inflammatory effects of complement inhibitors possessing sialyl Lewisx moieties. J. Immunol.* 162, 4952-4959.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A. e Stuart, D. I. (1999). *Tick histamine binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. Molecular Cell* 3, 661-671.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Nuttall, P. A. e Stuart, D. L. (2000). *Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. Biochim. Biophys. Acta.* 1482, 92-101.
- Pratt, J. R., Hibbs, M. J., Laver, A. J., Smith, R. A. e Sacks, S. H. (1996). *Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. Am. J. Patrol.* 149, 2055-2066.
- Rehrig, S., Fleming, S. D., Anderson, J., Guthridge, J. M., Rakstang, J., McQueen, C. E., Holers, V. M., Tsokos, G. C., Shea-Donohue, T. (2001). *Complement inhibitor, complement receptor 1-related gene/protein γ -Ig attenuates intestinal damage after the onset of mesenteric*

- ischaemia/reperfusion injury in mice. J. Immunol.* 167, 5921-5927.
- Ribeiro, J. M. C. (1987). *Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. Exp. Parasitol.* 64, 347-353
- Rollins, S. A., Birks, C. W., Setter, E., Squinto, S. P. e Rother, R. P. (1996). *Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response. Hum. Gene Ther.* 7, 619-626.
- Rollins, S. A., Fitch, J. C. K., Shernan, S., Rinder, C. S., Rinder, H. M., Smith, B. R., Collard, C. D., Stahl, G. L., Alford, B. L., Li, L. e Matis, L. A. (1998). *Anti-C5 single chain antibody therapy blocks complement and leukocyte activation and reduces myocardial tissue damage in CPB patients. Mol. Immunol.* 35, (1998), 397-397.
- Sahu, A. e Lambris, J. D. (2000). *Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. Immunopharmacology* 49, 133-148.
- Sambrook, J. *et al.*, (2000) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sandoval, A., Rong, A, Ostresh, J. M. e Ogata, R. T. (2000). *Distal recognition site for classical pathway convertase located in the C345C/Netrin module of complement component C5. The Journal of immunology*, 165, 1066-1073
- Schiller, B., Cunningham, P. N., Alexander, J. J., Bao, L., Holers, V. M., e Quigg, R. J. (2001). *Expression of a soluble complement inhibitor protects transgenic mice from antibody induced acute renal failure. J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 71-79.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. e Bork, P. (2000). *SMART: a web based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Res.* 28, 231-234.
- Smith G. P. e Smith, R. A. G. (2001). *Membrane-targeted complement inhibitors. Mol. Immunol.* 38, 249-255.

- Solomon, S., Kolb, C., Mohanty, S., Jeisy-Walder, E., Preyer, R., Schollhorn, V. e Illges, H. (2002). *Transmission of antibody-induced arthritis is independent of complement component 4 (C4) and the complement receptors 1 and 2 (CD21/35)*. *Eur. J. Immunol.* 32, 644-651.
- Tanaka, M., Murase, N., Ye, Q., Miyazaki, W., Nomoto, M., Miyazawa, H., Manez, R., Toyama, Y., Demetris, A. J., Todo, S. e Starzl, T. E. (1996). *Effect of anticomplement agent K76 COOH on hamster-to-rat and guinea pig-to-rat xenotransplantation*. *Transplantation* 62, 681-688.
- Thomas, H., Maillet, F., Letourner, D., Jozefonvicz, J., Fischer, E. e Kazatchkine, M. D. (1996). *Sulfonate dextran inhibits complement activation and complement dependent cytotoxicity in an in vitro model of hyperacute xenograft rejection*. *Mol. Immunol.* 33, 643-648.
- Vakeva, A. P., Agah, A., Rollins, S. A., Matis, L. A., Li, L. e Stahl, G. L. (1998). *Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion - Role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy*. *Circulation* 97, 2259-2267.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. (2000). *Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.*, 275, 18717-18723.
- Wang, Y., Rollins, S. A., Madri, J. A. e Matis, L. A. (1995). *Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8955-8959.
- Wang, Y., Hu, Q. L., Madri, J. A., Rollins, S. A., Chodera, A. e Matis, L. A. (1996). *Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5*. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 93, 8563-8568.
- Ward, P. A., Czermak, B. J., Huber-Lang, M., Diehl, K. e Friedl, H. P. (2000). *Use of animal models to define complement functions*. Em: Lambris, J. D., Holers, V. M. (Eds.), *Therapeutic Interventions in the Complement*

System. Humana Press, Totowa.

Weisman, H. F., Bartow, T., Leppo, M. K., Marsh, H. C. J., Carson, G. R., Concino, M. F., Boyle, M. P., Roux, K. H., Weisfeldt, M. L. e Fearon, D. T. (1990). *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppression post-ischaemic myocardial inflammation and necrosis*. *Science*, 249, 146-151.

Whaley, K., editor (1993). *Complement in health and disease*, 2ª edição. MTP, Lancaster.

Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A. H., Lambris, J. D., Alexander, J. J., Quigg, R. J. e Masliah, E. (2002). *Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10837-10842.

Zhang, H., Lu, S., Morrison, S. L. e Tomlinson, S. (2001). *Targetting of functional antibody decay accelerating factor fusion proteins to a cell surface*. *J. Biol. Chem.* 276, 27290-27295.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula inibidora do complemento em conjunção com um veículo farmacêuticamente aceitável, em que a molécula inibidora do complemento é um polipeptídeo compreendendo os aminoácidos 19 a 168 da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende os aminoácidos 1 a 168 da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a molécula inibidora do complemento inibe a via clássica do complemento e a via alternativa do complemento.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a molécula inibidora do complemento inibe a clivagem de C5 mediante uma C5 convertase.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a molécula inibidora do complemento inibe a clivagem de C5 mediante ligação direta a C5.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a molécula inibidora do complemento é complexada com C5.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante.

8. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula inibidora do complemento como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que é geneticamente ou quimicamente fundida a um ou mais peptídeos ou polipeptídeos, em que a proteína de fusão inibe a via clássica do complemento e a via alternativa do complemento e/ou

inibe a clivagem de C5 mediante uma C5 convertase.

9. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a molécula inibidora do complemento é geneticamente ou quimicamente fundida a (a) um domínio marcador, em opcionalmente em que dito domínio marcador é um rótulo radioquímico, ou (ii) uma proteína ou polipeptídeo que auxilia detecção, expressão, separação ou purificação da proteína ou pode prover propriedades adicionais à proteína.

10. Molécula de cDNA isolada, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) os nucleotídeos 55 a 507 da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifique a mesma sequência de aminoácidos; ou

(b) os nucleotídeos 1 a 507 da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifique a mesma sequência de aminoácidos.

11. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos, em que a dita sequência de nucleotídeos compreende:

(a) os nucleotídeos 55 a 507 da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifique a mesma sequência de aminoácidos; ou

(b) os nucleotídeos 1 a 507 da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2, ou uma sequência degenerada da mesma, que codifique a mesma sequência de aminoácidos.

12. Vetor de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sequência de nucleotídeos que codifica uma molécula inibidora do complemento compreende os nucleotídeos 1 a 507 da sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 2.

13. Célula hospedeira procariótica recombinante, caracterizada

pelo fato de que compreende um vetor como definido na reivindicação 11 ou 12.

14. Método para preparar uma molécula inibidora do complemento, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma célula hospedeira como definida na reivindicação 13 sob condições nas quais a dita proteína é expressa e recuperar a dita proteína então produzida.

15. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou da proteína de fusão como definida nas reivindicações 8 ou 9, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio mediada pelo complemento.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a dita doença ou distúrbio mediada pelo complemento é doença de Alzheimer, artrite reumatoide, glomerulonefrite, lesão de reperfusão, rejeição de transplante, sepse, distúrbio do complexo imune ou hipersensibilidade do tipo retardado.

17. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou da proteína de fusão como definida na reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de uma vacina para proteger um animal contra uma doença ou distúrbio transmitido por um artrópode hematófago.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o artrópode hematófago é *O. moubata*.

19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a doença ou distúrbio é febre recorrente, febre suína africana ou febre do Nilo Ocidental.

20. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser como ferramenta de diagnóstico.

Fig. 1

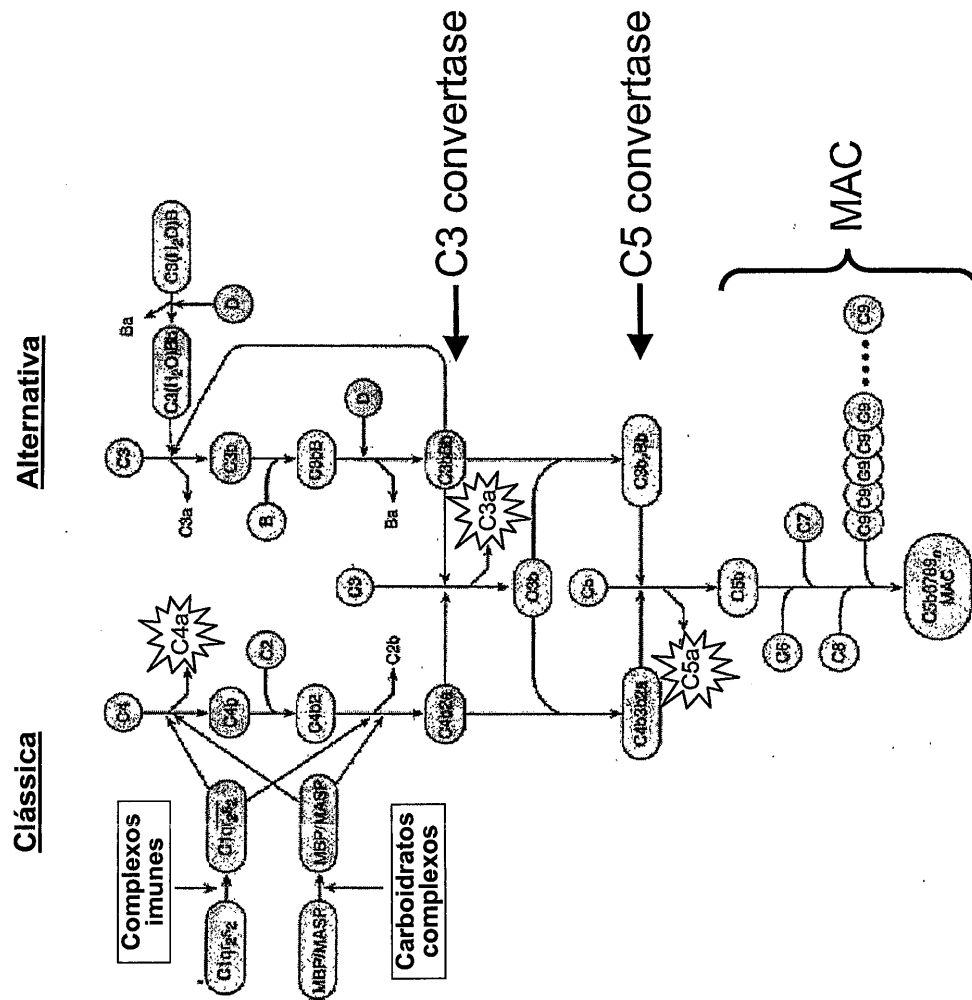
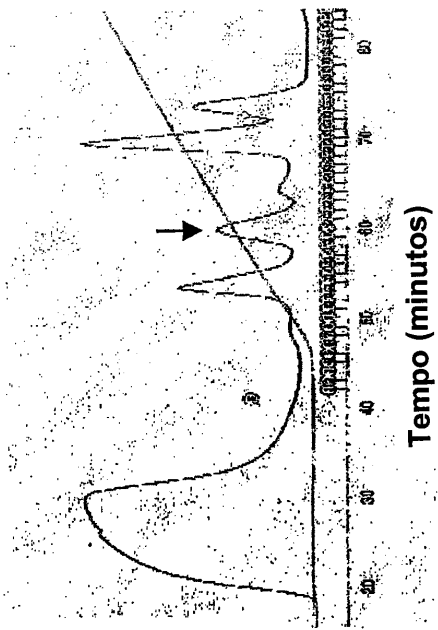


Fig. 2

a.

Cromatografia de troca de cátions



b.

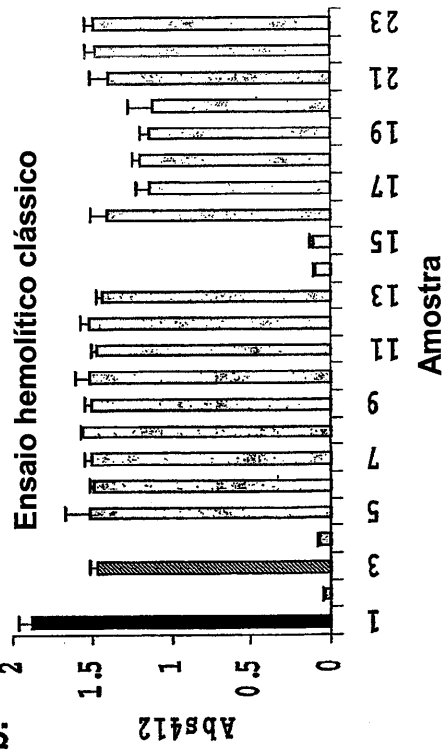


Fig. 3

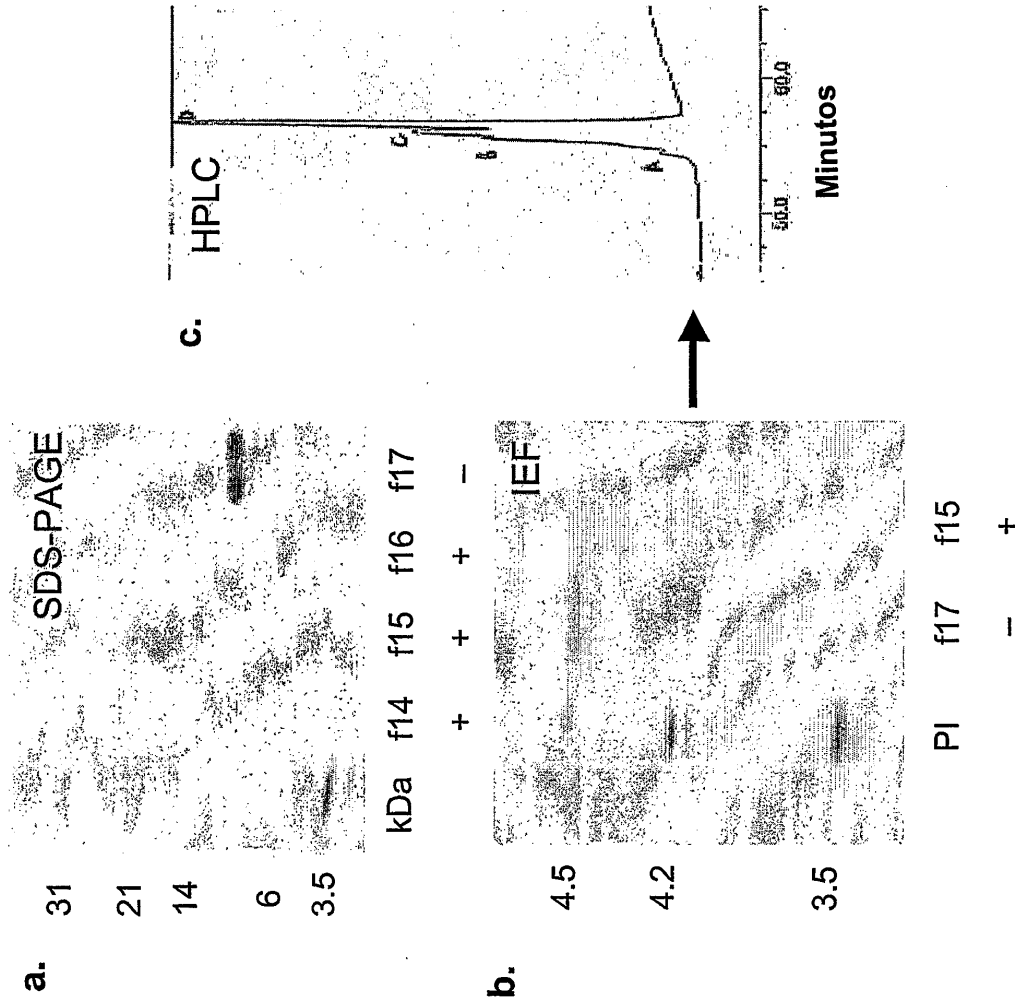


Fig. 4

ATGCTGTTTTGGTGACCCCTGATTTTCTCCTTTTCTGCGAACAATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A Y A D S 20
 GAAAGCGACTGCACTGGAAGCGAACCTGTGTGACGCCTTCCAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120
 E S D C T G S E P V D A F Q A F S E G K 40
 GAGGCATATGTCTGTGAGGTCCACGGATCCAAAGCGAGGGACTGCTTGAAAGGAGAA 180
 E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
 CCAGCCGGAGAAAAGCAGGACAAACAGTTGCCGGTGATGATGACGTTTAAGAATGGCACA 240
 P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
 GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTGGACGGCGCAAAGGTAACGGCAACCCCTT 300
 D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
 GGTAACCTAACCCAAAATAGGGAAGTGGTCTACGACTCGCAAAGTCACTGCCACGTT 360
 G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
 GACAAGGTCGAGAAGGAAGTTCACAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATCGGGAGGGCTT 420
 D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
 GAAGTGGAAGTCGAGTGTGCGGTCAAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
 E V E V E C C R Q K L E L A S G R N Q 160
 ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG 507
 M Y P H L K D C * 168

Fig. 5

OmCI .MLVILIFSESANLAYADSESDCSGSEPVDAFQAFSEGKEAYVLVRST
 TSGP3 MMLVIATVILSFSASTALAD...CPTGKPTEAYVAFNEGKGAYIILVRST
 TSGP2 MMLVIATVILSFSASTALAD...CPTGKPTEAYVAFNEGQGAYIILVKST
 Moubatin MMLVITTLIFSFSASIAAQS...CSVSDPLDALKAFAKDGAGTFLLQKST
 *** * * * * * * * * * * * * * * * * *

OmCI DPKARDCLKGEPAGEKQDNITLPVMMTFKNGTDWASTDWTFTLLDGAKVTAT
 TSGP3 NLNARDCLKGEATGKKEGNTLPVMMAFKDEGKVVSLPWTFITLDGPKVTAT
 TSGP2 DLDARDCLKGSATGKKEGKVEPVMMAFKNEGQWVSLPWTFITLDGPKVTAT
 Moubatin DPQARDCLKGTPNGNRDGNITLPVTTMTYKDDSKWVSLNMMFTLEGANIVAT
 ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *

OmCI L.GNLTQNRREVVDVSQSHHCHEVDKVEKEVPDYEMMMLDAGGLEVEVECCR
 TSGP3 H.GORTLKGEVVYDVPSHHCHIEKLESGA..YDMMMLEAGGLEVDIECCN
 TSGP2 D.GORTLKREVVDVASHHCHEVEKLASGA..YEMMMLEAGGLEVDIECCN
 Moubatin LEGKRKQRGELVYDVQSHDCHITKLSSGV..YQQWQSNGSADDDKDIKCCD
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

OmCI QKLEELASGRNQMYPHLKDC.....
 TSGP3 KRYDELTSQGVVIRPQDKDC.....
 TSGP2 KKYDELTSQGVVIRPQDKDC.....
 Moubatin EKFKELTSGIDYTKPQEKGCETSAC
 ** * * * * *

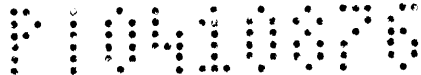


Fig. 6

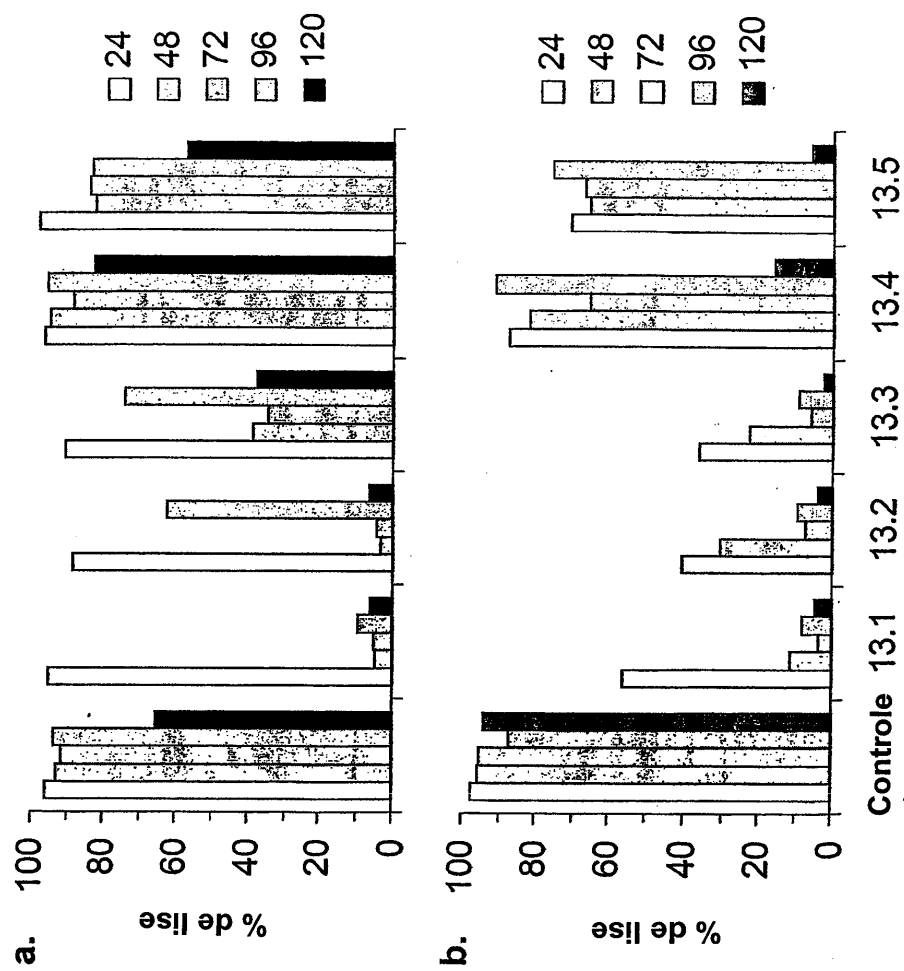
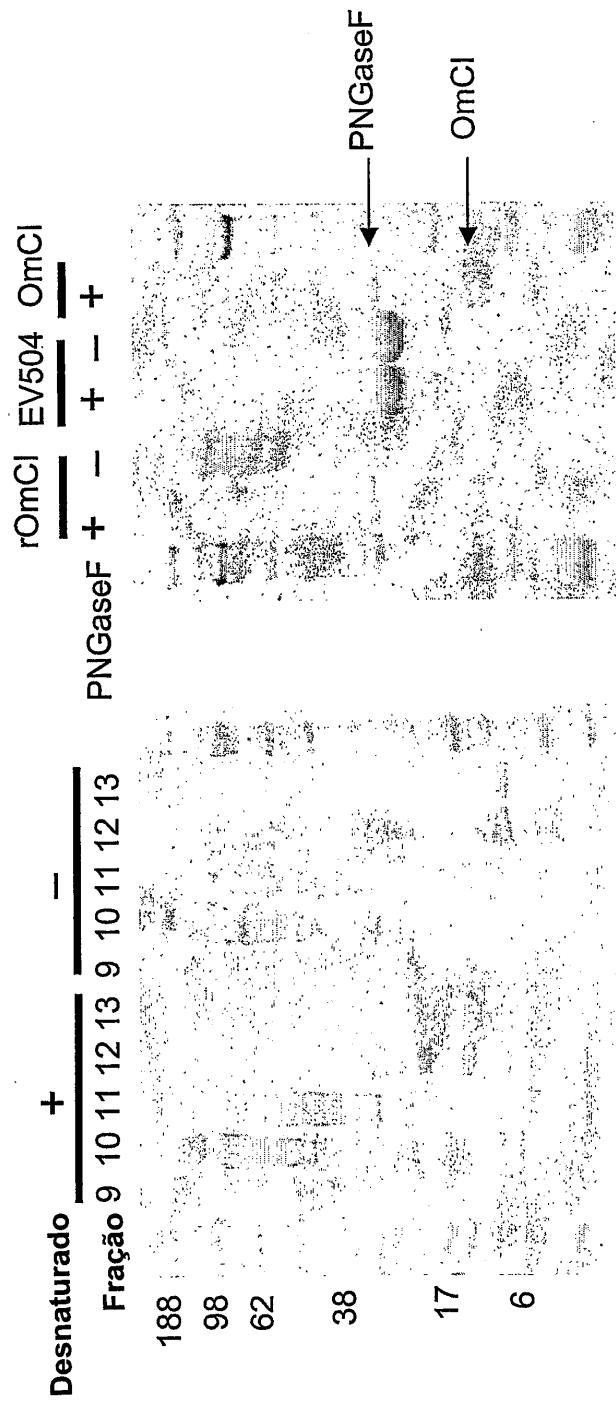


Fig. 7a

b

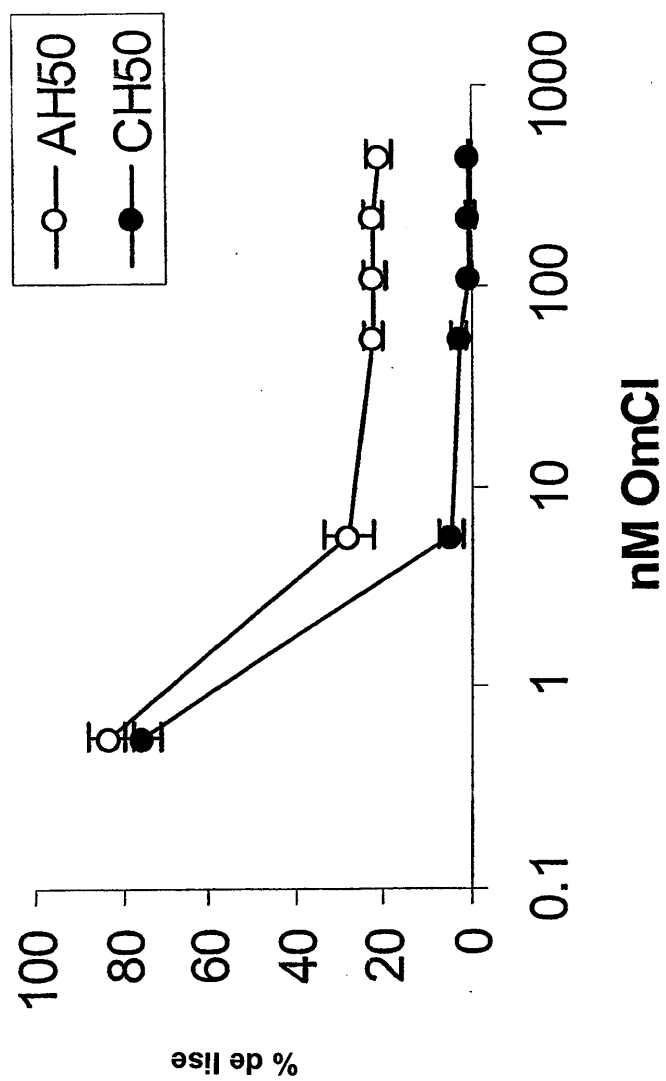


7/16

P 10410078

74

Fig. 8



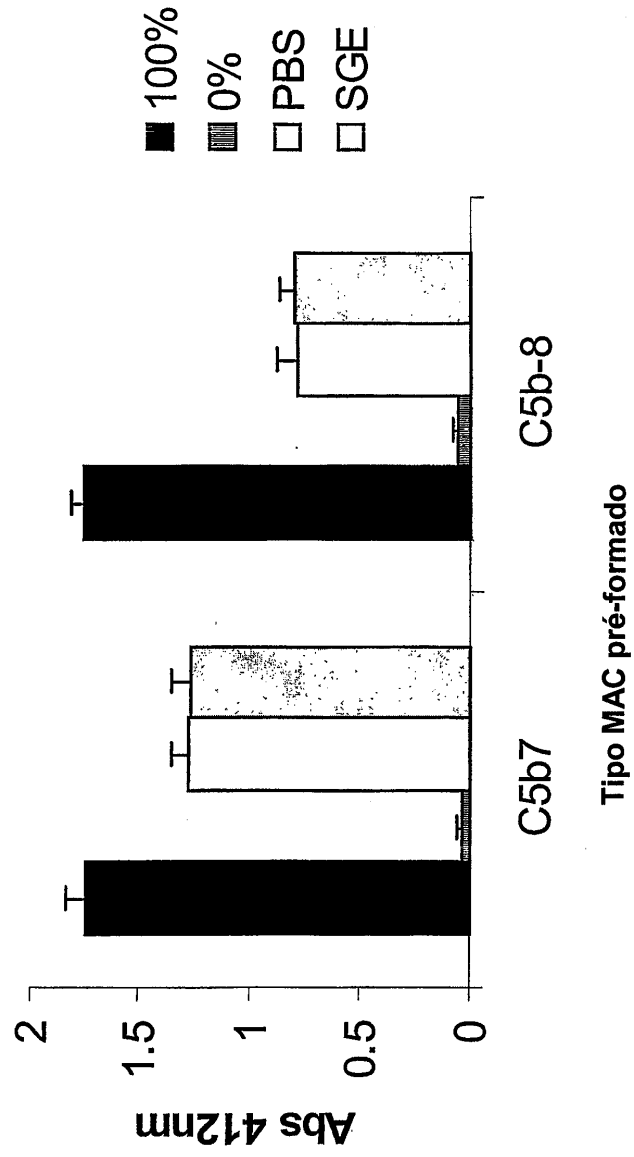
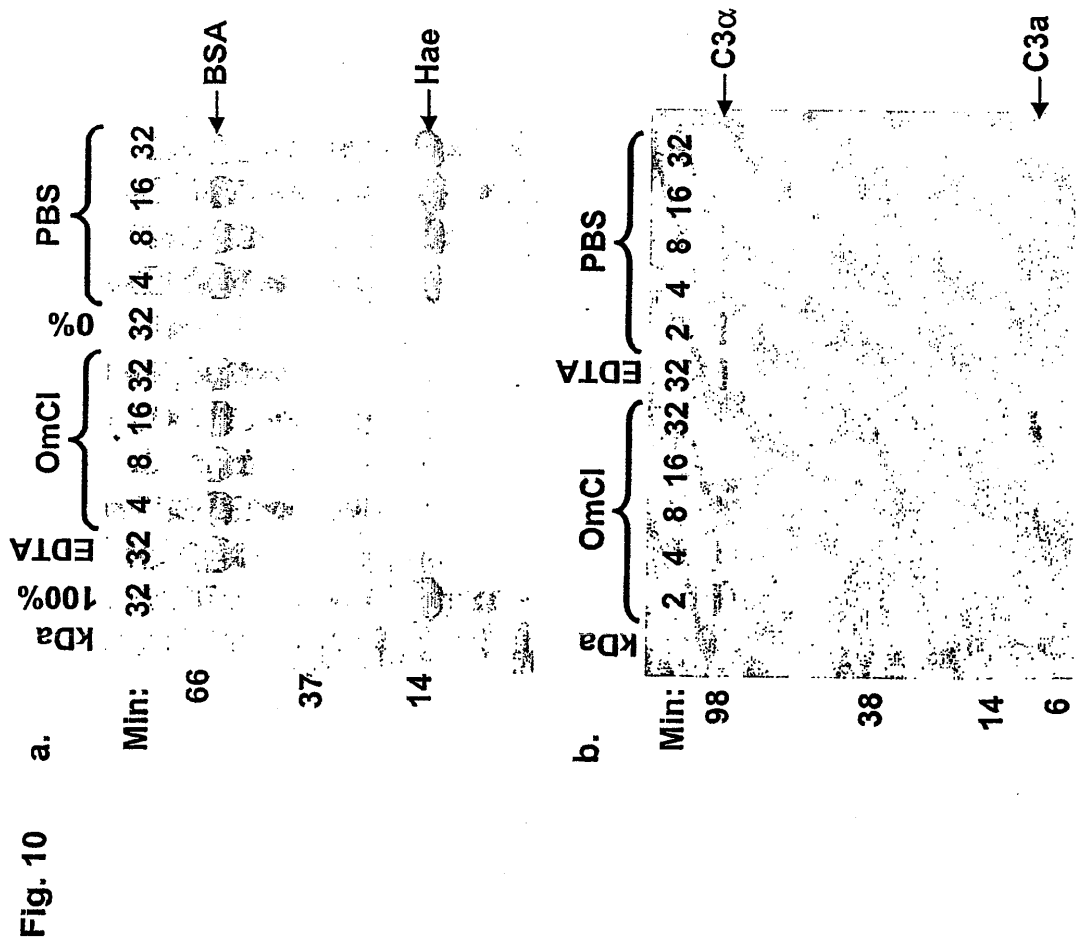


Fig. 9



10/16

Fig. 11

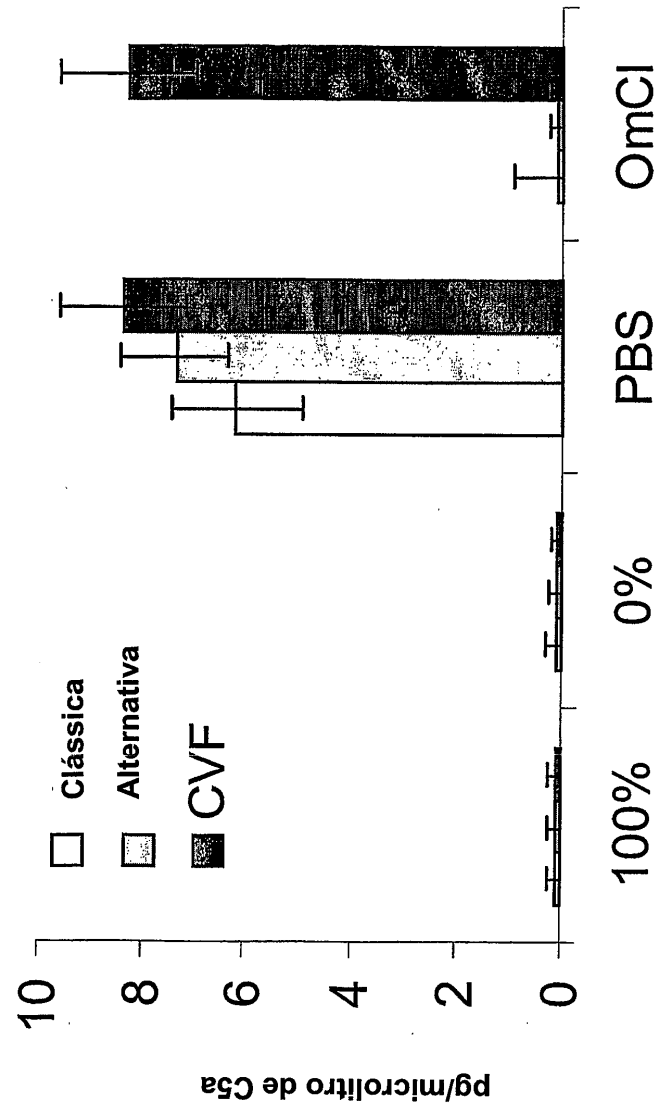


Fig. 12

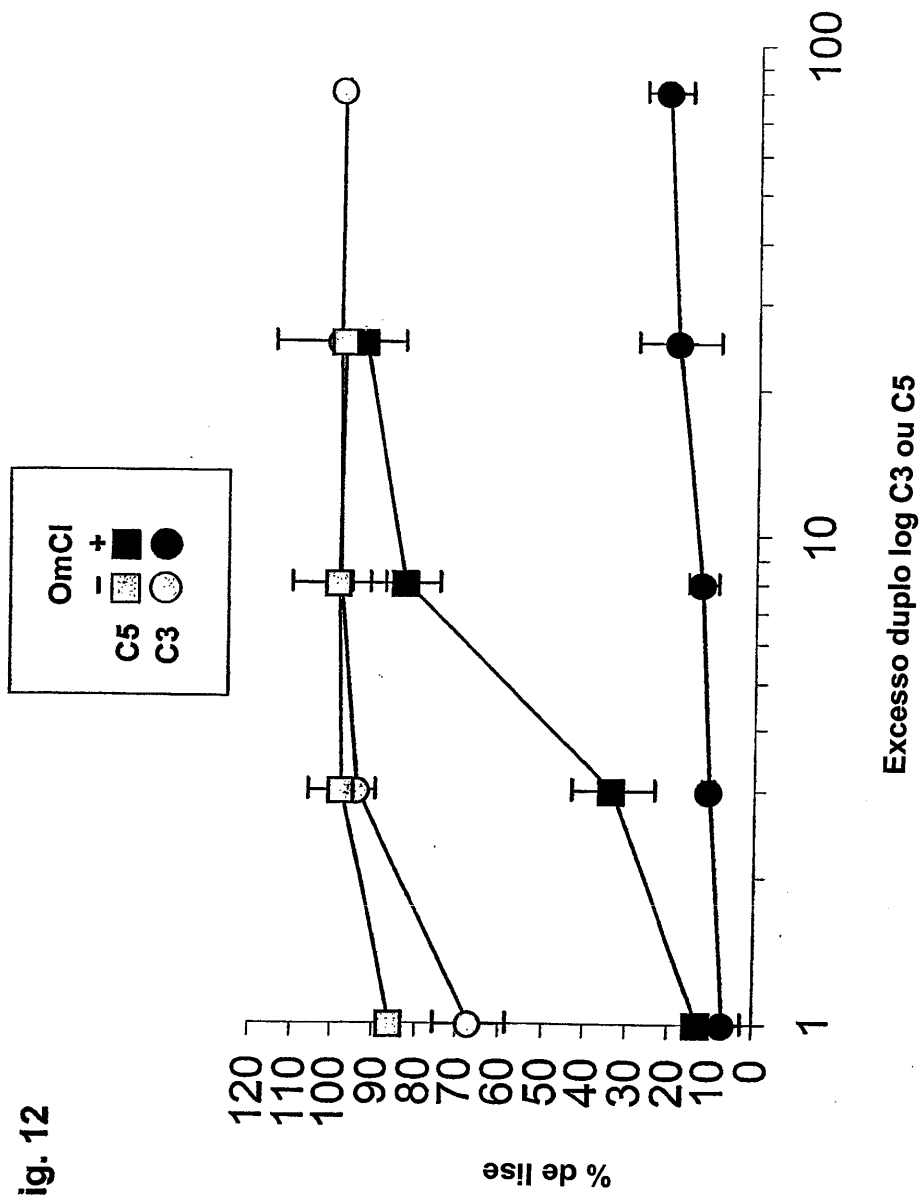


Fig. 13

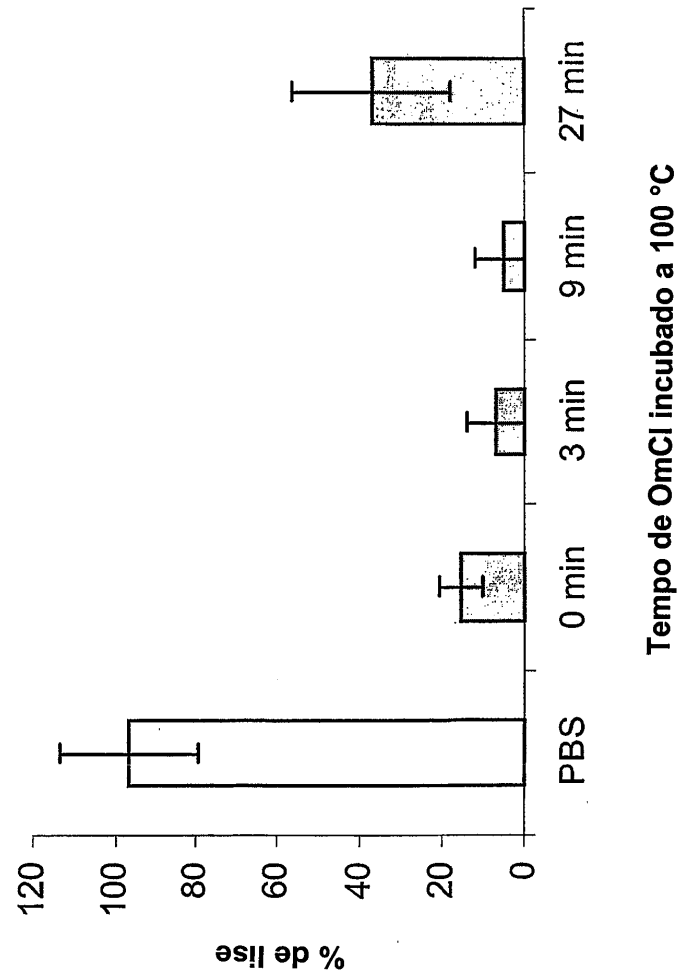


Fig. 14

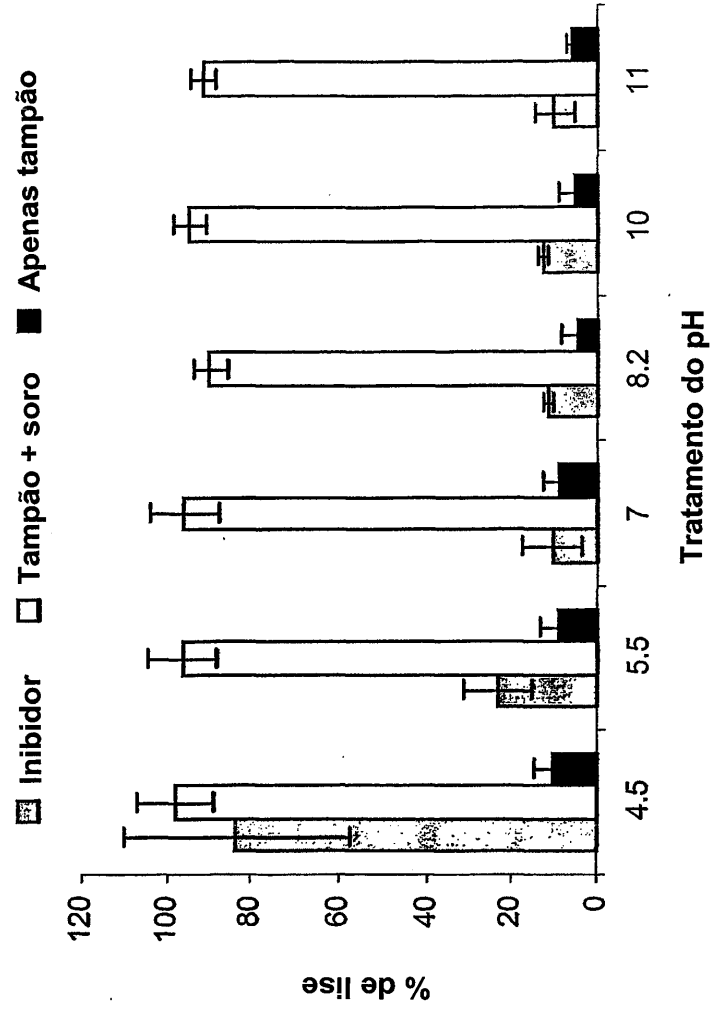


Fig. 15

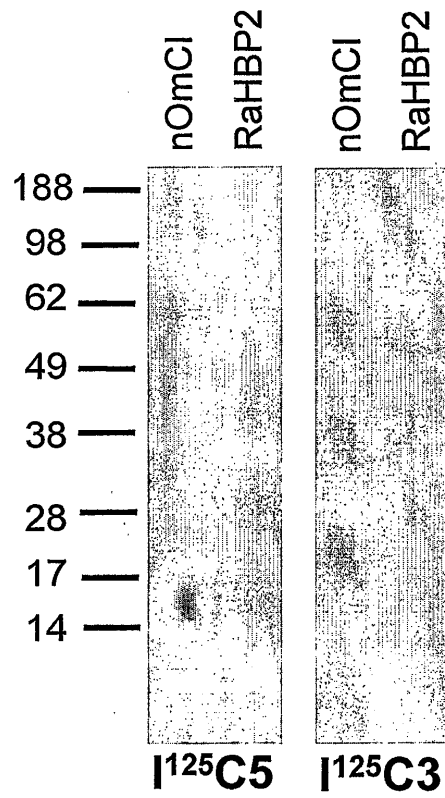


Fig. 16

