

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 279**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2018** **PCT/EP2018/060240**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018** **WO18193121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2018** **E 18719169 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3612207**

54 Título: **Variantes de Coversin que carecen de unión a C5**

30 Prioridad:

21.04.2017 GB 201706406

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

30.09.2024

73 Titular/es:

VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA
(100.0%)

Place Des Eaux Vives, 6 Case Postale 3461
1211 Genève 3, CH

72 Inventor/es:

NUNN, MILES ANDREW

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 279 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de Coversin que carecen de unión a C5

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polipéptidos de Coversin modificados que tienen actividad de unión a leucotrienos/hidroxiieicosanoides (LK/E) y unión a C5 reducida o ausente y composiciones que comprenden los mismos útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por eicosanoides y, en particular, a compuestos modificados derivados de garrapatas modificados que tienen actividad de unión a leucotrienos/hidroxiieicosanoides (LK/E) para el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por leucotrienos e hidroxiieicosanoides, y en particular LTB₄.

Antecedentes de la invención

Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos oxigenados biológicamente activos que se derivan del ácido araquidónico (AA), un ácido graso de 20 carbonos, a través de tres vías enzimáticas principales: la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa (LO) y la citocromo P450 monooxigenasa (CYP450). Los eicosanoides incluyen los prostanooides (incluidas las prostaglandinas, PG, y los tromboxanos, TXB) derivados de la vía de COX, los leucotrienos (LK) de la vía de LO y los ácidos hidroxiieicosatetraenoico (HETE) y los ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) de las vías de la LO y de la P450 monooxigenasa (Curtis-Prior, 2004; Peters-Golden y Henderson Jr., 2007). Los eicosanoides median numerosos efectos sobre diversos tipos de células y órganos. Estos efectos incluyen la regulación del tono vascular y la permeabilidad de capilares y vénulas (PGs, TBXs, LKs), la contracción o relajación muscular (PGs, TBXs, cisteinil LKs), la estimulación o inhibición de la función plaquetaria (TBXs, PGs, LKs), la regulación del flujo sanguíneo renal y el metabolismo mineral (Imig, 2000; Hao y Breyer, 2007), control del crecimiento y/o propagación de células malignas (Schwartz et al, 2005; Aya, 2006), y activación de leucocitos en particular en condiciones autoinmunes e inflamatorias (LKs, HETEs) (Samuelsson, 1983; Kim y Luster, 2007).

El leucotrieno B₄ (LTB₄) es el eicosanoide quimiotáctico y quimiocinético más potente descrito y promueve la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular mediante la regulación por incremento de integrinas (Hoover et al, 1984). También es un secretagogo completo para los neutrófilos, induce su agregación y aumenta la permeabilidad microvascular. LTB₄ recluta y activa las células asesinas naturales, los monocitos y los eosinófilos. Aumenta la formación de radicales superóxidos (Harrison y Murphy, 1995) y modula la expresión génica, incluyendo la producción de una serie de citoquinas y mediadores proinflamatorios que pueden aumentar y prolongar la inflamación tisular (Ford-Hutchinson, 1990; Showell et al., 1995). LTB₄ también desempeña funciones en la inducción y la gestión de respuestas inmunitarias adaptativas. Por ejemplo, regulación del tráfico de células dendríticas para drenar los ganglios linfáticos (Klaas et al, 2005; Del Prete et al, 2007), la producción de la citoquina Th2 IL-13 a partir de células T pulmonares (Miyahara et al, 2006), el reclutamiento de células T efectoras CD8⁺ específicas de antígeno (Taube et al, 2006) y la activación y proliferación de linfocitos B humanos (Yamaoka et al, 1989).

El leucotrieno B₄ (LTB₄) y los hidroxiieicosanoides median sus efectos a través de los receptores acoplados a proteínas G de BLT1 y BLT2 (Yokomizo et al, 1997, 2000). El BLT1 humano es un receptor de alta afinidad (K_D 0,39-1,5 nM; Tager y Luster, 2003) específico para LTB₄ con sólo 20-hidroxi LTB₄ y 12-epi LTB₄ capaz de desplazar a LTB₄ en estudios de unión competitiva (Yokomizo et al., 2001). El BLT2 humano tiene una afinidad 20 veces menor (K_D 23 nM) por la LTB₄ que el BLT1 y se activa al unirse a un intervalo más amplio de eicosanoides, incluyendo la 12-epi LTB₄, la 20-hidroxi LTB₄, el 12(S)- y el 15(S)-HETE y el 12(S)- y el 15(S)-HPETE (Yokomizo et al., 2001). El BLT2 humano tiene un 45,2 y un 44,6% de identidad aminoacídica con el BLT1 humano y de ratón, mientras que el BLT2 humano y de ratón tienen un 92,7% de identidad (Yokomizo et al, 2000).

El BLT1 humano se expresa principalmente en la superficie de los leucocitos, aunque recientemente se ha descrito en células endoteliales y células musculares lisas vasculares. El BLT2 humano se expresa en una variedad más amplia de tejidos y tipos celulares. Se han descrito una serie de antagonistas específicos de BLT1 y BLT2 que inhiben la activación, extravasación y apoptosis de neutrófilos humanos (Kim y Luster, 2007) y reducen los síntomas provocados por la infiltración de neutrófilos en modelos de ratón de artritis inflamatoria (Kim et al., 2006) y reperusión de isquemia renal (Noiri et al., 2000). Cada vez más estudios indican que tanto BLT1 como BLT2 pueden mediar efectos patológicos a través de LTB₄ e hidroxiieicosanoides (Lundeen et al., 2006), aunque BLT1 tiene sin duda un papel dominante en algunas patologías como la artritis inducida por colágeno en ratones (Shao et al, 2006). Los ratones deficientes en BLT1/- también han puesto de relieve la importancia de BLT1 en el direccionamiento de la migración de neutrófilos en las respuestas inflamatorias. En particular, se usó una cepa de ratón deficiente en 5LO para demostrar que la activación autocrina de BLT1 en los neutrófilos es necesaria para su reclutamiento en las articulaciones artríticas (Chen et al., 2006).

Los derivados isoméricos oxidados de LTB₄, como los isoleucotrienos B₄, también son biológicamente activos (Harrison et al, 1995). Al igual que los hidroxiieicosanoides, por ejemplo el 5(S)-HETE es un quimioatrayente muy potente para los eosinófilos (Powell y Rokach, 2005). Los cisteinil LK, que se derivan de LTA₄, están

correlacionados con la fisiopatología del asma, que incluye: broncoconstricción provocada por la contracción del músculo liso que recubre las vías respiratorias; edema de la mucosa provocado por la fuga vascular; aumento de la secreción de moco; y presencia de un infiltrado de células inflamatorias rico en eosinófilos (Bisgaard et al., 1985; Drazen et al., 1988).

Una serie de fármacos comercializados se dirigen a los eicosanoides. Entre ellos se encuentran los glucocorticoides, que modulan la fosfolipasa A2 (PLA₂) e inhiben de este modo la liberación del precursor eicosanoide AA (Sebaldt et al., 1990). Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y otros inhibidores de la COX2 que impiden la síntesis de PG y TXB (Curry et al., 2005). También hay una serie de modificadores de LK que inhiben la enzima 5-LO necesaria para la síntesis de LTB₄ (Zileuton; Dube et al., 1998), o antagonizan el receptor CysLT₁ que media los efectos de los cisteinil leucotrienos (Zafirlukast y Montelukast) (Sharma y Mohammed, 2006). Los modificadores de LK están disponibles por vía oral y han sido aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento, por ejemplo, del asma. Todavía no ha llegado al mercado ningún fármaco que actúe específicamente sobre LTB₄ o sus receptores.

La WO2004/106369 describe un inhibidor del complemento (C) derivado de garrapatas blandas, Coversin, que inhibe las vías clásica, lectina y alternativa del complemento mediante la unión directa al componente C5 del complemento (Nunn et al, 2005). La Coversin procede de las glándulas salivales de artrópodos hematófagos. Tiene un potencial terapéutico demostrado (Hepburn et al, 2007). La Coversin impide la activación del componente 5 de C (C5) mediada por el complemento (C) en una amplia variedad de especies de mamíferos, incluyendo los humanos (Barratt-Due, A., et al. (2011) J. Immunol. 187, 4913-4919)). Al unirse directamente a los dominios CUB, C5d y C5-C345C C5, Coversin impide la escisión de C5 por las convertasas del complemento C5, evitando de este modo la liberación de anafilatoxina C5a y la formación de C5b, que nuclea la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) que comprende los componentes del complemento complejo C5b-9 (consultar, por ejemplo, Jore et al. 2016). También se ha demostrado que la Coversin se une a eicosanoides, en particular LKs, especialmente LTB₄ (Roversi, P., et al., (2013) J. Biol. Chem. 288:18789-18802) encerrándolos entonces dentro del cuerpo de la proteína. Se sabe que la Coversin puede unir LTB₄ y C5 simultáneamente, y que los sitios de unión están situados en caras opuestas de la Coversin, y que el bolsillo de unión de LTB₄ es totalmente accesible en el complejo C5-Coversin (Jore et al. 2016).

La WO 2009/0984S4 describe el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por eicosanoides. Mans B.J. et al, (2008) describe la función, el mecanismo y la evolución del clado de moubatina de lipocalinas de garrapatas blandas.

Sumario de la invención

Se ha descubierto que el polipéptido de Coversin puede modificarse para reducir o eliminar su actividad de unión a C5 (y, por tanto, su actividad inhibidora del complemento) a la vez que se conserva la actividad de unión a leucotrienos/hidroxeicosanoides (LK/E) (por ejemplo, la actividad de unión a LTB₄). En particular, los presentes inventores han demostrado que la modificación de polipéptidos de Coversin que comprenden la SEQ ID NO: 3 en residuos específicos puede reducir o eliminar la unión a C5.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a versiones modificadas de polipéptidos de Coversin que comprenden la SEQ ID NO: 3 como se define en las reivindicaciones, específicamente en donde el polipéptido modificado de Coversin muestra actividad de unión a leucotrienos o hidroxeicosanoides y unión a CS reducida o ausente, dicho polipéptido de Coversin modificado comprendiendo la SEQ ID NO: 3 en el que se realizan hasta 30 sustituciones de aminoácidos, en donde:

(i) en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 se realizan las siguientes sustituciones (a)-(e)

- a. Met116 se sustituye por Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His o Thr;
- b. Leu117 se sustituye por Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala o Pro;
- c. Gly121 se sustituye por Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro o His;
- d. Leu122 se sustituye por Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro o His; y
- e. Glu123 se sustituye por Ala, Asp, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr; y en donde

(ii) Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro o His; y en donde

(iii) Asp149 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr, y en donde

(iv) Met114, Trp115, Asp118, Ala119, Gly120 y Val124 no están sustituidos,

o un fragmento del mismo en el que se suprimen hasta cinco aminoácidos del extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado, y a los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de Coversin modificados.

Tales polipéptidos de Coversin modificados, o polinucleótidos que codifican tales polipéptidos de Coversin

modificados actúan como inhibidores de LK/E y pueden usarse en la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por LK/E. Puede observarse que estas moléculas modificadas mostrarán una unión reducida o nula a C5 y, como consecuencia, habrá una inhibición reducida o nula de la convertasa C5, y una interferencia reducida o nula con la actividad del complemento.

La invención también se refiere a polipéptidos de Coversin modificados y nucleótidos codificantes de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades en las que están implicados en la patología de las enfermedades los leucotrienos, especialmente LTB₄ e hidroxiicosanoides. Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención pueden unirse y enjaular a LKs e hidroxiicosanoides. Esto puede impedir que los ligandos interactúen con los receptores tanto BLT1 como BLT2 y mejorar los efectos proinflamatorios de los ácidos grasos, que con frecuencia se ha demostrado que dependen de la señalización a través de ambos receptores. Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan los polipéptidos de Coversin modificados y nucleótidos codificantes de la invención para el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por un leucotrieno o hidroxiicosanoide.

Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por un leucotrieno o hidroxiicosanoide. Ejemplos de enfermedades y trastornos que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen el asma.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un polipéptido de Coversin modificado y un ácido graso. El ácido graso es preferiblemente un ácido graso terapéutico y se proporciona para su administración a un individuo.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado de la invención que generalmente está fusionado genéticamente o químicamente a uno o más péptidos o polipéptidos, opcionalmente

(i) que comprende una secuencia PAS; o

(ii) que comprende una secuencia PAS que consiste en 30 copias de la SEQ ID NO: 13, fusionada al extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado de la invención.

Descripción de las Figuras

La **Fig. 1(a)** muestra un diagrama esquemático de las vías clásica y alternativa de activación del complemento. Componentes enzimáticos, en gris oscuro. Anafilatoxinas dentro de estrellas. (b) muestra diagrama esquemático de la vía de los eicosanoides.

La **Fig. 2** muestra (A) Secuencia primaria de la Coversin. Secuencia señal subrayada. Residuos de cisteína en negrita. Número de nucleótidos y aminoácidos indicado a la derecha. (B) Ejemplos de variantes de Coversin

La **Fig. 3** muestra un gel de SDS-PAGE reductor de la Coversin de tipo salvaje (carril 1), la variante 1 de Coversin (carril 2) y la variante 2 de Coversin (carril 3) expresadas y purificadas a partir de *E. coli*.

La **Fig. 4** muestra trazas de resonancia de plasmón superficial para la Coversin de tipo salvaje y las variantes 1 y 2 de la Coversin que se unen a C5 (A), así como las versiones PASiladas de las mismas (B).

La **Fig. 5** muestra curvas de titulación de fluorescencia para la Coversin de tipo salvaje y las variantes 1 y 2 de la Coversin, a varias concentraciones, uniéndose a LTB₄ (A) así como a versiones PASiladas de las mismas (B).

La **Fig. 6** muestra las curvas de desnaturalización térmica de la Coversin de tipo salvaje y de las variantes 1 y 2 de la Coversin, medidas por espectroscopia de dicroísmo circular. También se muestra una tabla de valores para la temperatura de fusión de cada proteína.

La **Fig. 7** muestra el efecto de la Coversin de tipo salvaje y de las variantes 1 y 2 de la Coversin sobre la lisis de glóbulos rojos de oveja mediada por C5, medida mediante un ensayo CH50. Los resultados de este ensayo mostrados en la figura 7 se usan como una medición indirecta de la capacidad de la Coversin de tipo salvaje y las variantes 1 y 2 para inhibir el C5.

La **Fig. 8** muestra el efecto de la L-Coversin sobre el número de eosinófilos y neutrófilos en el líquido broncoalveolar y los pulmones de modelos de ratón de asma. Los ratones asmáticos fueron expuestos a ácaros del polvo doméstico (HDM) antes de la administración de L-Coversin. Se introdujo solución salina tamponada con fosfato en los grupos de ratones de control en lugar de la exposición a HDM.

La **Fig. 9** muestra el efecto de la L-Coversin de acción prolongada (PAS-L-Coversin) en el modelo de ratón de EBA (A-experimento 1, B experimento 2).

Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia polinucleotídica de la Coversin de *Ornithodoros moubata*.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la Coversin de *Ornithodoros moubata* (es decir, los aminoácidos 1-168). La secuencia presenta un giro entre beta H y alfa2 en los aminoácidos 132 a 142.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 19 a 168 mostrada en la SEQ ID NO: 2 y es la

secuencia de aminoácidos de la Coversin de *Ornithodoros moubata* sin la primera secuencia de 18 aminoácidos de la proteína de la SEQ ID NO: 2, que es una secuencia señal. La secuencia presenta un giro entre beta H y alfa2 en los aminoácidos 114 a 124.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 3

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de una Coversin modificada en la que la SEQ ID NO: 3 se ha modificado para cambiar Met114 por Gln, Met116 por Gln, Leu117 por Ser, Asp118 por Asn, Ala119 por Gly, Gly120 por Ser, Gly121 por Ala, Leu122 por Asp, Glu123 por Asp y Val124 por Lys. (variante 1 de Coversin)

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de una Coversin modificada de acuerdo con la presente invención en la que la SEQ ID NO: 3 se ha modificado para cambiar Ala44 por Asn, Met116 por Gln, Leu117 por Ser, Gly121 por Ala, Leu122 por Asp, Glu123 por Ala y Asp149 por Gly. (variante 2 de Coversin)

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de una Coversin modificada, modificada para cambiar Ala44 por Asn, Met116 por Gln, Leu122 por Asp y Asp149 por Gly. (variante 3 de Coversin)

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de una Coversin modificada, modificada para cambiar Ala44 por Asn. (variante 4 de Coversin).

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos del giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 (posiciones de aminoácidos 132-142 de la SEQ ID NO: 2).

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos del giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 1 de Coversin (SEQ ID NO: 5).

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos del giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 2 de Coversin (SEQ ID NO: 6).

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos del giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 3 de Coversin (SEQ ID NO: 7).

SEQ ID NO:13 a 19 son secuencias PAS.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un polipéptido de Coversin modificado que presenta actividad de unión a leucotrienos o hidroxieicosanoides y unión a C5 reducida o ausente, dicho polipéptido de Coversin modificado comprendiendo la SEQ ID NO: 3 en el que se realizan hasta 30 sustituciones de aminoácidos, en donde

(i) en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 se realizan las sustituciones (a)-(e):

a. Met116 se sustituye por Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His o Thr;

b. Leu117 se sustituye por Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala o Pro;

c. Gly121 se sustituye por Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro o His;

d. Leu122 se sustituye por Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro o His; y

e. Glu123 se sustituye por Ala, Asp, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr; y en donde

(ii) Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro o His; y en donde

(iii) Asp149 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr, y en donde

(iv) Met114, Trp115, Asp118, Ala119, Gly120 y Val124 no están sustituidos,

o un fragmento del mismo en el que se suprimen hasta cinco aminoácidos del extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado.

También se proporciona una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención que generalmente está fusionado genéticamente o químicamente a uno o más péptidos o polipéptidos, opcionalmente

(i) que comprende una secuencia PAS; o

(ii) que comprende una secuencia PAS que consiste en 30 copias de la SEQ ID NO: 13, fusionada al extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, así como un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, y una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención.

También se proporciona un método para preparar un polipéptido de Coversin modificado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención o una proteína de fusión de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la invención en condiciones por las que se expresa dicha proteína y recuperar dicha proteína producida de este modo.

También se proporciona una composición que comprende un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 Se proporciona además un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención para su uso en terapia.

10 También se proporciona un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o composición de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por un leucotrieno o hidroxyeicosanoide, así como un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por un leucotrieno o hidroxyeicosanoide en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto de acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o composición de acuerdo con la invención.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos de Coversin modificados o polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos de Coversin modificados para el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por leucotrienos o hidroxyeicosanoides.

20 Se proporciona además un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la invención, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o composición de acuerdo con la invención para su uso en un método para tratar el asma.

25 Polipéptidos de Coversin modificados

El polipéptido de Coversin modificado de la invención se basa en un inhibidor del complemento derivado de la garrapata, aislado de la saliva de *Ornithodoros moubata*. Esta proteína se aisló por primera vez de las glándulas salivales de la garrapata y se ha descubierto que inhibe las vías clásica y alternativa del complemento, así como el leucotrieno y los hidroxyeicosanoides, (en particular LTB₄). La secuencia de aminoácidos de esta proteína se muestra en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención puede ser una versión modificada de la secuencia completa mostrada en la SEQ ID NO: 2.

30 En realizaciones alternativas, el polipéptido de Coversin modificado se proporciona en una forma que no incluye los primeros 18 aminoácidos de la secuencia proteica (una secuencia señal). Por consiguiente, un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención puede ser una versión modificada de la SEQ ID NO: 3, es decir, de los aminoácidos 19 a 168 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

35 A lo largo de esta solicitud, las referencias a un "polipéptido de Coversin modificado" deben entenderse como una referencia a una versión modificada de cualquiera de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, es decir, el polipéptido de Coversin con o sin la secuencia señal de 18 aminoácidos que se ve en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2.

40 Cuando un aminoácido particular dentro de la SEQ ID NO: 3 se define por referencia al número de su posición en la SEQ ID NO: 3, este aminoácido también puede definirse por referencia al número de su posición en la SEQ ID NO: 2 y este número será 18 mayor que para la SEQ ID NO: 3 debido a la presencia de la secuencia señal de 18 aminoácidos en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2.

45 La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de Coversin modificados de la invención varía de la de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 hasta en 30 aminoácidos como se especifica en las reivindicaciones, pero conserva en cierto grado la actividad de unión a LK/E como se observa con el polipéptido de Coversin no modificado. Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención también presentan una unión a C5 reducida o ausente en comparación con los polipéptidos de Coversin no modificados de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3. La actividad de unión a LK/E, como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de unirse a leucotrienos e hidroxyeicosanoides incluyendo, entre otros, LTB₄, isoleucotrienos B4 y cualquier derivado hidroxilado de los mismos, HETEs, HPETEs y EETs. La unión a LTB₄ es de particular interés.

50 Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención pueden consistir en la SEQ ID NO: 2 o 3, modificados como se define en las reivindicaciones, como de acuerdo con la descripción que sigue, o pueden comprender la SEQ ID NO: 2 o 3, modificados como se define en las reivindicaciones, como de acuerdo con la descripción que sigue.

55 El polipéptido de Coversin no modificado de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 presenta un giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 (posiciones de aminoácidos 132-142 de la SEQ ID NO: 2). Este giro tiene la secuencia que se muestra a continuación:

-Met-Trp-Met-Leu-Asp-Ala-Gly-Gly-Leu-Glu-Val- (SEQ ID NO: 9=

La primera Met se encuentra en la posición 114 de la SEQ ID NO: 3 y en la posición 132 de la SEQ ID NO: 2.

En la invención, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 están presentes las siguientes sustituciones (a)-(e):

- a. Met116 se sustituye por Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His o Thr, preferiblemente Gln o Al, por ejemplo, Gln;
- b. Leu117 se sustituye por Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala o Pro, preferiblemente Ser o al, por ejemplo, Ser;
- c. Gly121 se sustituye por Ala, Asp, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, o His, preferiblemente Ala o Asn, por ejemplo, Ala;
- d. Leu122 se sustituye por Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys, Pro o His, preferiblemente Asp o Al, por ejemplo, Asp; y
- e. Glu123 se sustituye por Asp, Ala, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr, preferiblemente Asp, Ala, Gln o Asn, por ejemplo Asp o Ala;

y adicionalmente Ala44 en la SEQ ID NO: 3 (Ala62 en la SEQ ID NO: 2) se sustituye por Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, o His, preferiblemente Asn,

y adicionalmente Asp149 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His, o Thr, y en donde

Met114, Trp115, Asp118, Ala119, Gly120, y Val124 no están sustituidos.

En algunas realizaciones, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 estén presentes las siguientes sustituciones:

- a. Met116 se sustituye por Gln;
 - b. Leu117 se sustituye por Ser;
 - c. Gly121 se sustituye por Ala;
 - d. Leu122 se sustituye por Asp;
 - e. Glu123 se sustituye por Ala;
- y Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn.

En aspectos preferidos de esta realización, los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 son los expuestos en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 estén presentes las siguientes sustituciones:

- a. Met116 se sustituye por Gln;
 - b. Leu122 se sustituye por Asp;
- y Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn

En algunas realizaciones, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que Asp149 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly.

En algunas realizaciones, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 estén presentes las siguientes sustituciones:

- a. Met116 se sustituye por Gln;
- b. Leu117 se sustituye por Ser;
- c. Gly121 se sustituye por Ala;
- d. Leu122 se sustituye por Asp;
- e. Glu123 se sustituye por Ala;

Ala44 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn y Asp149 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly149.

En aspectos preferidos de esta realización, los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 son los expuestos en la SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el polipéptido de Coversin se modifica de tal manera que en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 estén presentes las siguientes sustituciones:

- a. Met116 se sustituye por Gln;
- b. Leu122 se sustituye por Asp;

Ala44 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn y Asp149 de la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly149.

En los varios aspectos y realizaciones de esta divulgación, los polipéptidos de Coversin modificados de la invención difieren de los polipéptidos de Coversin no modificados de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3 hasta en 30 aminoácidos como se especifica en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones de la invención, los seis aminoácidos de cisteína en las posiciones 6, 38, 100, 128, 129, 150 de la SEQ ID NO: 3 se conservan en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención.

En algunas realizaciones, Asn60 y Asn84 en la SEQ ID NO: 3 se sustituyen cada uno por Gln. Esta modificación puede llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio para evitar la hiperglicosilación ligada a N cuando el polipéptido se expresa en células eucariotas (por ejemplo, levadura, planta, mamífero).

En algunas realizaciones, se cree que uno o más de los siguientes aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 están implicados en la unión a LTB₄ y, por lo tanto, pueden conservarse en forma no modificada: Phe18, Tyr25, Arg36, Leu39, Gly41, Pro43, Leu52, Val54, Met56, Phe58, Thr67, Trp69, Phe71, Gln87, Arg89, His99, His101 y Asp103. En algunas realizaciones, por lo menos cinco, diez o quince, o todos estos aminoácidos se conservan en forma no modificada en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención. En algunas realizaciones, uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse de manera conservadora. En algunas realizaciones, hasta cinco, diez o quince, o todos estos aminoácidos se sustituyen de manera conservadora en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención.

Los aminoácidos en las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 3 están altamente conservados entre la Coversin y TSGP2 y TSGP3: 5, 6, 11, 13-15, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 69-81, 83, 84, 86, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148, y 150.

Se cree que los aminoácidos en las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 3 están implicados en la unión a LTB₄ y/o están altamente conservados entre la Coversin y TSGP2 y TSGP3: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 43, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 97-104, 112-113, 115, 125-129, 132-139, 145, 148 y 150.

Se cree que los aminoácidos en las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 3 están implicados en la unión a LTB₄ y/o están altamente conservados entre Coversin y TSGP2 y TSGP3: 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-25, 27, 30-32, 35-41, 43, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 98, 100, 102-104, 112-113, 115, 126, 128-129, 132-139, 145, 148 y 150.

En algunas realizaciones, por lo tanto, los aminoácidos anteriores se conservan en forma no modificada. En la invención, Trp115 no está sustituido. En algunas realizaciones, por lo menos cinco, diez o quince, o todos estos aminoácidos se conservan en forma no modificada en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención. En algunas realizaciones, uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse de manera conservadora. En algunas realizaciones, hasta cinco, diez o quince, o veinte de estos aminoácidos están sustituidos de manera conservadora en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención.

Los polipéptidos de Coversin modificados que tienen el giro entre beta H y alfa2 en las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 (posiciones de aminoácidos 132-142 de la SEQ ID NO: 2) como se expone en la SEQ ID NO: 11 tienen 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 3 como resultado de la presencia de este giro. En algunas realizaciones, los polipéptidos de Coversin modificados de la invención tienen por lo tanto preferiblemente 1-20, 2-15, 3-10, o hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sustituciones adicionales en comparación con la SEQ ID NO: 3 más allá de las que se exponen en la SEQ ID NO: 6.

Las sustituciones distintas de las mencionadas explícitamente anteriormente son preferiblemente sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

5	Alifático	No-polar	G A P
			I L V
		Polar - no cargado	C S T M
			N Q
		Polar - cargado	D E
10	Aromático		K R
			H F W Y

Las sustituciones también pueden seleccionarse basándose en residuos que se encuentran en variantes, como un homólogo de la proteína Coversin obtenido de *Ornithodoros moubata*. Tales homólogos pueden incluir paralogos y ortólogos de la secuencia de la Coversin que se expone en la SEQ ID NO: 2 o 3, incluyendo, por ejemplo, la secuencia de la proteína Coversin de otras especies de garrapatas incluyendo *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *A. americanum*, *A. cajennense*, *A. hebraeum*, *Boophilus microplus*, *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. andersoni*, *D. marginatus*, *D. variabilis*, *Haemaphysalis inermis*, *Ha. leachii*, *Ha. punctata*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hy. dromedarii*, *Hy. marginatum marginatum*, *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis*, *I. hexagonus*, *Argas persicus*, *A. reflexus*, *Ornithodoros erraticus*, *O. moubata moubata*, *O. m. porcinus* y *O. savignyi*.

La presente invención también abarca fragmentos del polipéptido de Coversin modificado de la SEQ ID NO: 3 en los que se suprimen hasta cinco aminoácidos del extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado. El fragmento puede corresponder a 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones del extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado.

Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención también pueden proporcionarse como una proteína de fusión que comprende el polipéptido de Coversin modificado fusionado genética o químicamente con otro péptido. Una proteína de fusión puede obtenerse, por ejemplo, clonando un polinucleótido que codifique el polipéptido de Coversin modificado en el marco de las secuencias codificantes de una secuencia de proteínas heteróloga. El término "heterólogo", cuando se usa en la presente, se pretende que designe cualquier polipéptido distinto del polipéptido de Coversin modificado de la invención. Ejemplos de secuencias heterólogas, que pueden incluirse en las proteínas de fusión solubles en el extremo N- o C-terminal, son los siguientes: dominios extracelulares de proteína unida a membrana, regiones constantes de inmunoglobulinas (región Fc), PAS o XTEN u otros polipéptidos no estructurados similares, dominios de multimerización, dominios de proteínas extracelulares, secuencias de señalización, secuencias de exportación o secuencias que permiten la purificación por cromatografía de afinidad. Muchas de estas secuencias heterólogas están disponibles comercialmente en plásmidos de expresión, ya que estas secuencias se incluyen comúnmente en las proteínas de fusión para proporcionar propiedades adicionales sin perjudicar significativamente la actividad biológica específica de la proteína fusionada con ellas. Ejemplos de tales propiedades adicionales son una vida media más duradera en los fluidos corporales (por ejemplo, como resultado de la adición de una región Fc o pasilación (Schlupschy M, et al Protein Eng Des Sel. agosto 2013; 26(8):489-501), la localización extracelular, o un procedimiento de purificación más fácil como el que permite una etiqueta como una etiqueta de histidina, GST, FLAG, avidina o HA. Las proteínas de fusión pueden contener además secuencias conectoras (por ejemplo, de 1-50, 2-30, 3-20, 5-10 aminoácidos de longitud), de tal manera que los componentes estén separados por este conector.

Las proteínas de fusión son, por tanto, ejemplos de proteínas que comprenden polipéptidos de Coversin modificados, e incluyen a modo de ejemplo específico una proteína que comprende una secuencia PAS y una secuencia de polipéptidos de Coversin modificada. Las secuencias PAS se describen, por ejemplo, en Schlupschy M, et al Protein Eng Des Sel. agosto 2013; 26(8):489-501, y la EP 08773567.6, describiéndose una molécula de Coversin PASilada en Kuhn et al Bioconjugate Chem., 2016, 27 (10), pp 2359-2371. La PASilación describe la fusión genética de una proteína con secuencias polipeptídicas conformacionalmente desordenadas compuestas por los aminoácidos Pro, Ala, y/o Ser. Se trata de una tecnología desarrollada por XL Protein (<http://xl-protein.com/>) y proporciona una manera sencilla de unir una cadena aleatoria solvatada con gran volumen hidrodinámico a la proteína a la que se fusiona. La secuencia polipeptídica adopta una estructura de bobina aleatoria voluminosa. El tamaño de la proteína de fusión resultante es, por tanto, mucho más grande que el de la proteína a la que se fusiona. Se ha demostrado que esto reduce la depuración en sistemas biológicos. Las secuencias PAS adecuadas se describen en la EP08773567.6, así como en la referencia de Schlupschy mencionada anteriormente. En la proteína de fusión puede usarse cualquier secuencia PAS adecuada. Los ejemplos incluyen una secuencia de aminoácidos que consiste en por lo menos 100 residuos de aminoácidos que forman una conformación de espiral aleatoria y consisten en residuos de alanina, serina y prolina (o consisten en residuos de prolina y alanina). Puede comprender una pluralidad de repeticiones de aminoácidos, en donde dichas repeticiones consisten en residuos de Ala, Ser y Pro (o residuos de prolina y alanina) y en donde no más de 6 residuos de aminoácidos consecutivos son idénticos. Los residuos de prolina pueden constituir más del 4% y menos del 40% de los aminoácidos de la secuencia. La secuencia puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 13);
 AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 14);
 APSSSPSPAPSSSPASPSS (SEQ ID NO: 15),
 SAPSSSPSPAPSSSPASPS (SEQ ID NO: 16),
 SSPSPSPSPSPSPSPSPA (SEQ ID NO: 17),
 AASPAAPSAPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 18) y
 ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 19)

o versiones circulares permutadas o múltiplos de estas secuencias como un todo o partes de estas secuencias. Puede haber, por ejemplo, 5-40, 10-30, 15-25, 18-20, preferiblemente 20-30 o 30 copias de una de las repeticiones presentes en la secuencia PAS, es decir, una de las SEQ ID NO 13-19, preferiblemente 13. Preferiblemente, la secuencia PAS comprende o consiste en 30 copias de la SEQ ID NO:13. Preferiblemente, la secuencia PAS se fusiona con el extremo N terminal de la proteína tipo Coversin (directamente o a través de una secuencia conectora) y, en ciertas realizaciones preferidas, la proteína tipo Coversin puede comprender o estar formada por la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, o la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:8, por ejemplo. la proteína de fusión comprende (a) una secuencia PAS que consiste en 30 copias de la SEQ ID NO:13 y (b) (i) la SEQ ID NO:5, o (iii) la SEQ ID NO:6, o (iii) la SEQ ID NO:7, o (iv) la SEQ ID NO:8, en donde (a) está fusionada al extremo N terminal de (b) directamente o mediante una secuencia conectora.

En algunas realizaciones, el conector comprende uno o más residuos de alanina, por ejemplo, de 1 a 5 residuos de alanina, por ejemplo, un único residuo de alanina.

Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención pueden estar químicamente modificados, por ejemplo, modificados postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden estar glicosilados, pegilados, fosforilados o contener residuos de aminoácidos modificados. Tales polipéptidos modificados entran dentro del alcance del término "polipéptido" usado en la presente. En otras realizaciones, los polipéptidos de Coversin modificados de la invención no se modifican químicamente, por ejemplo, se modifican postraduccionalmente (por ejemplo, no se glicosilan, pegilan o fosforilan).

Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. En el caso de que los polipéptidos de la invención se hayan expresado en una célula huésped, puede ser que se hayan separado de por lo menos un componente de la célula huésped y/o del medio de crecimiento en el que se expresó. Se entenderá que el polipéptido de Coversin modificado puede mezclarse con portadores o diluyentes que no interfieran con el propósito pretendido del polipéptido y seguir considerándose sustancialmente aislado. Un polipéptido para su uso en la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más del 50%, por ejemplo más del 80%, 90%, 95% o 99%, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención. Esto puede determinarse, por ejemplo, mediante electroforesis o cromatografía.

Los polipéptidos de Coversin modificados también pueden elaborarse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, un polipéptido de Coversin recombinante puede producirse transfectando células de mamífero, hongo, bacteria o insecto en cultivo con un vector de expresión que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido de Coversin modificado enlazado operativamente a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo y purificando el polipéptido de Coversin modificado producido por las células. Los polipéptidos también pueden modificarse tras su producción sintética o recombinante. Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden producirse usando D-aminoácidos. En tales casos, los aminoácidos se enlazarán en secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es convencional en la técnica de producción de tales polipéptidos.

En la técnica se conocen una serie de modificaciones de las cadenas laterales que pueden realizarse en las cadenas laterales de los polipéptidos de Coversin modificados, siempre que los polipéptidos de Coversin modificados conserven la actividad de unión a LK/E y presenten una actividad inhibidora del complemento reducida o ausente (por ejemplo, actividad de unión a C5 del complemento).

Polinucleótidos

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican los polipéptidos de Coversin modificados de la invención. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de Coversin modificado o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención puede usarse para tratar una enfermedad o afección mediada por leucotrienos o eicosanoides.

En particular, el polinucleótido puede comprender o consistir en: (a) una secuencia codificante correspondiente a la de la SEQ ID NO: 1 (o nucleótidos 55 a 507 de la misma) con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de

la invención; (b) una secuencia que es degenerada como resultado del código genético a la secuencia como se define en (a); o (c) un fragmento de cualquiera de las secuencias como se define en (a), o (b) que codifica un polipéptido modificado de acuerdo con la invención que tiene actividad de unión a LK/E (por ejemplo, como se describe en la presente en relación con los polipéptidos modificados) y actividad inhibidora del complemento reducida o ausente (por ejemplo como se describe en la presente en relación con los polipéptidos modificados). Típicamente, el polinucleótido es ADN, por ejemplo, ADNc. Sin embargo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, y puede incluir nucleótidos sintéticos o modificados.

En algunas realizaciones, en lugar de que la secuencia codificante corresponda a la de la SEQ ID NO: 1, la secuencia codificante corresponderá a la de los nucleótidos 55 a 507 de la secuencia de nucleótidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 1). Esta secuencia de nucleótidos codifica la proteína de Coversin de la Figura 2 sin la secuencia señal, es decir, codifica la SEQ ID NO:3. Las primeras 54 bases de la secuencia de nucleótidos de la Figura 2 codifican la secuencia señal, que no es necesaria para la actividad inhibidora del complemento ni para la actividad de unión a LTB4. Por tanto, los polinucleótidos de la invención pueden comprender o consistir en versiones modificadas de los nucleótidos 55 a 507 de la secuencia de nucleótidos de la Figura 2 (SEQ ID NO: 1).

Un polinucleótido de la invención puede hibridar típicamente con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 (o nucleótidos 55 a 507 de la misma) con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención a un nivel significativamente superior al de fondo. La hibridación de fondo puede producirse, por ejemplo, debido a otros ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 (o nucleótidos 55 a 507 de la misma) con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención es típicamente por lo menos 10 veces, preferiblemente por lo menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 (o nucleótidos 55 a 507 de la misma). La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, radiomarcando la sonda, por ejemplo con ³²P. La hibridación selectiva puede lograrse típicamente usando condiciones de rigurosidad media a alta. Sin embargo, dicha hibridación puede llevarse a cabo en cualquier condición adecuada conocida en la técnica (consultar Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Por ejemplo, si se requiere una alta rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60°C hasta 65°C. Si se requiere una rigurosidad menor, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60°C.

El polinucleótido mencionado anteriormente puede modificarse alternativa o adicionalmente para que incluya secuencias que codifiquen la extensión en uno o ambos extremos o internamente en las regiones de giro del polipéptido. También pueden incluirse secuencias adicionales, como secuencias de señalización, o secuencias que codifiquen otro péptido o proteína para ayudar a la detección, expresión, separación o purificación de la proteína, o que codifiquen un péptido, como un péptido Fc, PAS u otras moléculas, como se menciona en otras partes de la presente, para aumentar la semivida circulante de la proteína, como se ha mencionado anteriormente. Entre los ejemplos de otros compañeros de fusión se incluyen la beta-galactosidasa, la glutatión-S-transferasa o la luciferasa.

El polinucleótido modificado generalmente codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a LK/E. Pueden realizarse sustituciones degeneradas y/o sustituciones que den como resultado una sustitución conservadora de aminoácidos cuando se traduzca la secuencia modificada, por ejemplo como se muestra en la Tabla anterior. Una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de la SEQ ID NO: 1 con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención tendrán generalmente por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% o por lo menos un 99% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 (o nucleótidos 55 a 507 de la misma) con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención sobre una región de por lo menos 20, preferiblemente por lo menos 30, por ejemplo por lo menos 40, por lo menos 60, por lo menos 100, por lo menos 200, por lo menos 420, o más preferiblemente sobre toda la longitud de la SEQ ID NO: 1 (con los cambios necesarios para reflejar las modificaciones realizadas en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 en los polipéptidos de Coversin modificados de la invención) que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 o 3, sujeto a las modificaciones realizadas en estas secuencias de acuerdo con la invención). La identidad de secuencia puede determinarse mediante cualquier método adecuado (como se analiza, por ejemplo, en Pearson, W. Curr Protoc Bioinformatics. junio 2013; 03, doi:10.1002/0471250953.bi0301s42).

Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden producirse de manera recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas estándar. Los polinucleótidos se suministran típicamente en forma aislada y/o purificada.

Los polinucleótidos descritos en la presente tienen utilidad en la producción de polipéptidos para su uso en la presente invención, que puede tener lugar in vitro, in vivo o ex vivo. Los polinucleótidos pueden usarse como agentes

terapéuticos por derecho propio o pueden participar en la síntesis de proteínas recombinantes. Los polinucleótidos para su uso en la invención se incorporan típicamente en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, los polinucleótidos para su uso en la invención pueden realizarse introduciendo un polinucleótido de Coversin en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped en condiciones que provoquen la replicación del vector. La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula de *E. coli*.

Vectores

La invención también incluye vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico de este aspecto de la invención. Tales vectores de expresión pueden incorporar las secuencias de control transcripcional y traslacional apropiadas, por ejemplo elementos potenciadores, regiones promotoras-operadoras, secuencias de parada de terminación, secuencias de estabilidad del ARNm, codones de inicio y parada o sitios de unión ribosomal, enlazados en marco con las moléculas de ácidos nucleicos de la invención.

Preferiblemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado, como se define en la presente. Las secuencias codificantes también pueden seleccionarse para proporcionar un uso de codones preferido adecuado para el organismo huésped que se vaya a usar. Otros vectores adecuados serían evidentes para los expertos en la técnica, consultar Sambrook et al. (1989). Preferiblemente, un polinucleótido para su uso en la invención en un vector está enlazado operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora, como un promotor, "enlazada operativamente" a una secuencia codificante se coloca de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

Los vectores de acuerdo con la invención incluyen plásmidos y virus (incluyendo tanto bacteriófagos como virus eucariotas), así como otros portadores de ADN lineal o circular, como los que emplean elementos transponibles o tecnología de recombinación homóloga.

Muchos de estos vectores y sistemas de expresión son conocidos y están documentados en la técnica (Fernández y Hoeffler, 1998). Entre los vectores víricos particularmente adecuados se encuentran los basados en baculovirus, adenovirus y virus vaccinia.

Entre los huéspedes adecuados para la expresión recombinante se incluyen especies procariotas de uso común, como *E. coli*, o levaduras eucariotas a las que puede hacerse que expresen altos niveles de proteínas recombinantes y que pueden cultivarse fácilmente en grandes cantidades. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura eucariota. También son adecuadas las líneas celulares de mamíferos cultivadas in vitro, particularmente cuando se usan sistemas de expresión impulsados por virus. Otro sistema de expresión adecuado es el sistema de expresión por baculovirus, que implica el uso de células de insecto como huéspedes. Un sistema de expresión también puede estar constituido por células huésped que tienen el ADN incorporado en su genoma.

Las proteínas o fragmentos de proteínas también pueden expresarse in vivo, por ejemplo en larvas de insectos o en tejidos de mamíferos.

Pueden usarse una variedad de técnicas para introducir los vectores de acuerdo con la presente invención en células procariotas o eucariotas. Las técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía (Sambrook et al, 1989; Ausubel et al, 1991; Spector, Goldman & Leinwald, 1998). En las células eucariotas, los sistemas de expresión pueden ser transitorios (por ejemplo, episomal) o permanentes (integración cromosómica), de acuerdo con las necesidades del sistema.

Células huésped

La invención también incluye células huésped procariotas o eucariotas transformadas o transfectadas que comprenden una molécula de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico antisentido o un vector como se ha definido anteriormente. Cuando las células huésped son procariotas, se trata preferiblemente de células de *E. coli*.

Las células huésped eucariotas preferidas incluyen las células de levadura eucariótica y las células de mamífero.

La invención también proporciona un método para preparar un polipéptido de Coversin modificado, como se ha definido anteriormente, que comprende cultivar una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención en condiciones en las que se expresa la proteína y recuperar la proteína producida de este modo. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura o una célula de *E. coli*.

Composiciones

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende un polipéptido de Coversin modificado, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado, de acuerdo con los aspectos de la invención descritos anteriormente, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

El término "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, incluye genes, polipéptidos, anticuerpos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y partículas de virus inactivos o, de hecho, cualquier otro agente, siempre que el excipiente no induzca por sí mismo efectos de toxicidad o cause la producción de anticuerpos que sean perjudiciales para el individuo que recibe la composición farmacéutica. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener además líquidos como agua, solución salina, glicerol, etanol o sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento del pH y similares. A modo de ejemplo, puede usarse una solución en agua o PBS.

Los excipientes pueden permitir que las composiciones farmacéuticas se formulen en comprimidos, píldoras (incluyendo píldoras mecánicas), grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones, emulsiones, pomadas, cremas, pulverizaciones en aerosol, para facilitar la ingesta por parte del paciente. También pueden usarse nanopartículas para la administración de sustancias terapéuticas o la iontoforesis. En Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991) hay disponible un análisis exhaustivo de los portadores farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polipéptido de Coversin modificado, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado, de acuerdo con los aspectos de la invención descritos anteriormente, para su uso en terapia.

La invención también proporciona un polipéptido de Coversin modificado, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado, de acuerdo con los aspectos de la invención descritos anteriormente, para su uso en un método para tratar a un animal que padece una enfermedad o trastorno mediado por LK/E (en particular LTB₄).

Preferiblemente, dicho animal es un mamífero, más preferiblemente un humano.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto necesaria para tratar o mejorar una enfermedad o afección objetivo. La dosificación exacta dependerá generalmente del estado del paciente en el momento de la administración. Entre los factores que pueden tenerse en cuenta al determinar la dosificación se incluyen la gravedad del estado de la enfermedad en el paciente, el estado general de salud del paciente, la edad, el peso, el sexo, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades a las reacciones y la tolerancia o respuesta del paciente a la terapia.

La cantidad precisa puede determinarse mediante experimentación rutinaria, pero en última instancia puede depender del criterio del practicante clínico. Preferiblemente, la dosis del agente es suficiente para ligar tanta LK/E disponible, por ejemplo LTB₄ como sea posible en el sujeto, más preferiblemente, toda la LK/E disponible, por ejemplo LTB₄.

La frecuencia con la que debe administrarse la dosis dependerá de la semivida del agente implicado. El polipéptido de Coversin modificado puede administrarse como una infusión continua, en dosis de bolo, diariamente, dos veces al día o cada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, 10, 15 o 20 días o más. Una ventaja particular de los polipéptidos de Coversin modificados es la relativa facilidad y rapidez con que pueden administrarse, y el hecho de que no se requieren profesionales médicos para administrar la proteína.

Pueden administrarse dosis individuales o múltiples. Por ejemplo, pueden administrarse por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis. Las dosis individuales son una realización. La dosificación exacta y la frecuencia de las dosis también pueden depender del estado del paciente en el momento de la administración. Los factores que pueden tenerse en consideración al determinar la dosificación incluyen la necesidad de tratamiento o profilaxis, la gravedad del estado de la enfermedad en el paciente, la salud general del paciente, la edad, el peso, el sexo, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades a las reacciones y la tolerancia o respuesta del paciente a la terapia. La cantidad precisa puede determinarse mediante experimentación rutinaria, pero en última instancia puede depender del criterio del practicante clínico.

El régimen de dosificación también puede adoptar la forma de una "dosis de carga" inicial seguida de una o más "dosis de mantenimiento" posteriores. En general, la dosis de carga será mayor que la dosis de mantenimiento.

La dosis de carga puede ser 2, 5, 10 o más veces mayor que la dosis de mantenimiento. La dosis de carga puede administrarse como dosis única, o como una o más dosis en un periodo de tiempo particular. Típicamente, la dosis de carga será de 1, 2, 3, 4 o 5 dosis administradas en un único periodo de 24 horas. La dosis de mantenimiento puede ser una dosis más baja que se repite a intervalos regulares. La dosis de mantenimiento puede repetirse a intervalos, como cada 3, 4, 6, 8, 12, 24 o 48 horas. El régimen preciso puede determinarse mediante experimentación rutinaria, pero en última instancia puede depender del criterio del practicante clínico. La dosis de mantenimiento puede ser por lo menos el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la dosis de carga inicial, o hasta el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% de la dosis de carga inicial.

En una realización adicional, se usa la misma dosis durante todo el tratamiento (por ejemplo, diariamente).

El polipéptido de Coversin modificado, una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado o puede administrarse mediante cualquier vía de administración conocida. Puede administrarse local o sistémicamente. Puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección, ya sea subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o en el espacio intersticial de un tejido). Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas, agujas e hipodermis. La administración local puede incluir la administración tópica. Preferiblemente se administra mediante inyección subcutánea.

Enfermedades y afecciones

Los presentes inventores han descubierto que los polipéptidos de Coversin modificados como se define en las reivindicaciones tienen la capacidad de unirse a E/LK, por ejemplo LTB₄, pero muestran unión a C5 reducida o nula. LTB₄ es el eicosanoide quimiotáctico y quimiocinético más potente descrito y promueve la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular a través de la regulación por incremento de las integrinas. LTB₄ induce la agregación de neutrófilos y, a través de diversos procesos, desempeña un papel en la inflamación. Se ha demostrado que LTB₄ desempeña funciones en la inducción y la gestión de respuestas inmunitarias adaptativas. Por tanto, los polipéptidos de Coversin modificados, que tienen la capacidad de unirse y enjaular los leucotrienos y los hidroxieicosanoides, pueden evitar que estos ligandos interactúen con los receptores BLT1 y BLT2 y pueden usarse para mejorar los efectos proinflamatorios de los ácidos grasos.

Los ejemplos de enfermedades y trastornos que pueden tratarse usando polipéptidos de Coversin modificados de la presente invención incluyen asma.

Complemento y actividad LK/E

Los polipéptidos de Coversin modificados de la invención presentan actividad de unión a leucotrienos o hidroxieicosanoides. Como resultado de las modificaciones de la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2 o 3, los polipéptidos de Coversin modificados también muestran una actividad de unión al complemento C5 reducida o ausente (en relación con la secuencia de aminoácidos de Coversin no modificada en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3).

Unión a C5 reducida/ausente

La capacidad de un polipéptido modificado de la invención para unirse a la proteína C5 del complemento, incluyendo C5 de sujetos con polimorfismos de C5, puede determinarse mediante ensayos in vitro estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante transferencia western después de la incubación de la proteína en el gel con C5 marcado o resonancia de plasmón superficial (consultar, por ejemplo, el Ejemplo 2).

La Coversin de tipo salvaje se une a C5 e impide su escisión por la convertasa de C5 en suero de rata, ratón y humano con una IC₅₀ de aproximadamente 0,02 mg/ml. Se ha demostrado que la proteína Coversin se une a C5 con una K_D de 1 nM, determinada mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) (consultar, por ejemplo, el Ejemplo 2).

Los polipéptidos de Coversin modificados mostrarán preferiblemente una capacidad reducida de unirse a C5 en comparación con el polipéptido de Coversin no modificado. En las realizaciones preferidas, los polipéptidos de Coversin modificados pueden no mostrar una unión detectable a C5.

En algunas realizaciones de la invención, la unión a C5 se reduce, por ejemplo, en por lo menos 2, 5, 10, 15, 20, 50, 100 veces, o se elimina en relación con la unión mostrada por el polipéptido de Coversin no modificado en la SEQ ID NO: 2 o 3.

En algunas realizaciones, la unión a C5 se reduce en por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% en relación con el polipéptido de Coversin no modificado de la SEQ ID NO: 2 o 3.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de Coversin modificados se unen a C5 con una K_D mayor de 1 micromolar según se determina por Resonancia de Plasmón de Superficial de acuerdo con el método descrito en Roversi et al. (2013) J Biol Chem. 288, 18789-18802, o como se expone en el Ejemplo 2.

5 En algunas realizaciones, los polipéptidos de Coversin modificados inhiben la lisis de glóbulos rojos de oveja en menos del 10% cuando están presentes a una concentración de 0,02 mg/ml en suero normal entero agrupado con el ensayo lítico CH50 realizado de acuerdo con o de manera similar a Giclas 1994.

10 La capacidad del polipéptido modificado de la invención para unirse a C5 puede determinarse midiendo la capacidad del agente para inhibir la activación del complemento en el suero. Por ejemplo, la actividad del complemento en el suero puede medirse mediante cualquier medio conocido en la técnica.

Unión a LK/E no afectada

15 El polipéptido de Coversin modificado de la invención puede inhibir la actividad de LK/E (por ejemplo, leucotrieno B4 (LTB₄)). En particular, el polipéptido de Coversin modificado de la invención se une a dichas moléculas. La capacidad de un agente para unirse a estas moléculas puede determinarse mediante ensayos in vitro estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante un ELISA competitivo entre la Coversin y un anticuerpo anti LK/E (por ejemplo, anti-LTB₄) que compita por unirse a LK/E marcado (por ejemplo, LTB₄). Un ensayo de este tipo se describe en Roversi et al 2013.

20 El polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la invención puede unirse a LK/E con la misma o mayor afinidad que la Coversin de tipo salvaje. También puede ser aceptable cierta reducción de la unión.

25 La unión de Coversin LTB₄ también puede expresarse en términos de la K_D , determinada mediante titulación por fluorescencia. Los datos obtenidos usando titulación por fluorescencia han demostrado que la Coversin de tipo salvaje se une a LTB₄ con una K_D de entre 200-300 pM. Los polipéptidos de Coversin modificados de acuerdo con la invención se unirán preferiblemente a LTB₄ con una K_D de menos de 5 nM, 2 nM o 1 nM, más convenientemente menos de 0,9 nM, más convenientemente menos de 0,8 nM, preferiblemente menos de 0,7 nM, más preferiblemente menos de 0,6 nM, preferiblemente menos de 0,5 nM, incluso más preferiblemente menos de 0,4 nM, y ventajosamente menos de 0,3 nM, en donde dicha K_D se determina usando titulación por fluorescencia, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3.

30 En algunas realizaciones, los polipéptidos de Coversin modificados compiten con el anticuerpo para unirse a LTB₄ de acuerdo con la metodología ELISA descrita en Roversi et al. (2013) J Biol Chem. 288, 18789-18802.

Ejemplos

40 La Variante 1 descrita en los ejemplos siguientes es solamente un ejemplo comparativo.

Ejemplo 1: Expresión de variantes de la Coversin en E. coli

45 Los constructos genéticos que codifican las variantes 1 (SEQ ID NO: 5) y 2 (SEQ ID NO: 6) de la Coversin se clonaron en vectores de expresión de E. coli que luego se transformaron en una cepa de expresión de E. coli. A continuación, se realizaron fermentaciones de los cultivos bacterianos con medio complejo usando un protocolo de fermentación establecido.

50 El cultivo celular clarificado resultante se concentró en tampón Bis-Tris 20 mM, pH 6,0, y se aplicó a una columna DEAE-Sefarosa FF (GE Healthcare), y luego se eluyó con un gradiente escalonado de NaCl en el mismo tampón. A continuación, las fracciones purificadas se pasaron a una columna de fenil Sefarosa HP usando un gradiente lineal de (NH₄)₂SO₄ en tampón Bis-Tris 20 mM. Las fracciones cromatográficas se analizaron con SDS-PAGE y se agruparon. En el caso de la variante 1 de la Coversin, se llevó a cabo un paso de purificación adicional en el que las fracciones proteicas agrupadas se aplicaron a una columna de filtración en gel Superdex 75. Para la variante 2 de la Coversin, se llevó a cabo un paso de purificación adicional en el que las fracciones de proteína agrupadas se aplicaron a una columna de intercambio iónico Q-sefariosa.

55 A continuación, las fracciones purificadas de las variantes 1 y 2 se analizaron en un gel SDS-PAGE junto con la Coversin de tipo salvaje. Los resultados se muestran en la Figura 3 y demuestran que ambas variantes de la Coversin se expresan bien en E. coli.

Ejemplo 2: Las variantes 1 y 2 de la Coversin pierden la actividad de unión a C5 con respecto a la Coversin de tipo salvaje.

60 Para medir la actividad de unión de la Coversin de tipo salvaje al C5 en relación con la actividad de unión de las variantes 1 y 2 de la Coversin, se llevaron a cabo experimentos SPR usando un instrumento Biacore (GE

Healthcare). Se usó solución salina tamponada con HEPES con 0,05% de Tween 20 como tampón de funcionamiento a un caudal de 30 µl/min y se inmovilizó C5 humano en un chip sensor CM3 hasta un total de 4800 RU.

Las mediciones de afinidad en tiempo real se realizaron a 25°C en un sistema BIAcore 2000 (GE Healthcare, Múnich, Alemania). El C5 humano (Complement Technology, Tyler, Tex., USA) se inmovilizó inicialmente en Na-acetato 10 mM pH 5,0 a una concentración de 25 µg/ml en un sensorchip CM3 (GE Healthcare) usando un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare), lo que dio como resultado una densidad de ligando de 4200-4800 unidades de resonancia (RU). La Coversin purificada, la variante 2 y la variante 1 se inyectaron en una serie de diluciones (0-96 nM para la Coversin) o a 1 µM en el caso de las variantes, en presencia de solución salina tamponada con HEPES (HBS; 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl) que contenía un 0,05% v/v de Tween 20 como tampón de funcionamiento (HBST-0,05). La formación del complejo se observó a un caudal continuo de 30 µl/min durante 240 s. Posteriormente, se dejó que la disociación prosiguiera durante 900 s antes de regenerar con 8 µl de tampón de elución ImmunoPure Gentle Ag/Ab (ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass., USA) para alterar la fuerte interacción electrostática entre Coversin y C5, seguido de la inyección de 120 µl de HBST-0.05 que contenía 1 mM de EDTA y 120 µl de HBST-0.05 para limpiar la celda de flujo. Los sensorgramas se corrigieron mediante sustracción doble de las señales correspondientes medidas para el canal en blanco de control en línea y un valor de referencia promediado determinado a partir de tres inyecciones en blanco de tampón, como se ha descrito anteriormente (Myszka D. G. (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit.* 12(5):279-284). Los parámetros cinéticos se determinaron usando el software BIAevaluation mediante el ajuste global de los datos a un modelo de unión de Langmuir para la formación de complejos bimoleculares.

Como se muestra en la Figura 4a, la Coversin se unió al C5 inmovilizado con una K_D de 1,45 nM. Por el contrario, cuando se llevó a cabo el mismo experimento con una única medición de las variantes 1 y 2 de la Coversin a 1 µM, ninguna de ellas produjo una respuesta significativa, lo que demuestra que ninguna de las variantes se une a C5. También se probaron las versiones PASiladas de las variantes 1 y 2 de la Coversin y se obtuvieron resultados similares (Figura 4B).

Ejemplo 3: La Coversin/variantes se unen a LTB₄ en el intervalo picomolar

La valoración por fluorescencia de la unión de la Coversin a LTB₄ se llevó a cabo para la Coversin de tipo salvaje y las variantes 1 y 2, así como para sus versiones PASiladas.

Se cuantificó la actividad de unión de la Coversin y las variantes 1 y 2 y las versiones PASiladas de las mismas para LTB₄ (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Mich., USA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un espectrofluorímetro LS 50 B (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA). Se aplicaron soluciones purificadas de 100 nM de las proteínas en 2 ml de PBS en una cubeta de cuarzo (10 mm de longitud de paso; Hellma, Mühlheim, Alemania) equipada con un agitador magnético. La temperatura se ajustó a 20°C y, una vez se hubo alcanzado el equilibrio, la fluorescencia Tyr/Trp de la proteína se excitó a 280 nm (anchura de la rendija: 15 nm). La emisión de fluorescencia se midió a 340 nm (anchura de la rendija: 16 nm) correspondiente al máximo de emisión. Se añadió paso a paso una solución de ligando de 30 µM LTB₄ en PBS, hasta un volumen máximo de 20 µl (1% del volumen total de la muestra), y después de 30 s de incubación se midió la fluorescencia en estado estacionario. Para calcular el valor K_D , se normalizaron los datos a una intensidad de fluorescencia inicial del 100%, se corrigió el efecto de filtro interno usando una titulación de 3 µM de solución de N-acetil-triptofanamida y se trazaron los datos frente a la concentración de ligando correspondiente. A continuación, se usó la regresión de mínimos cuadrados no lineales basada en la ley de acción de masas para la formación de complejos bimoleculares para ajustar los datos con el software Origin versión 8.5 (OriginLab, Northampton, Mass., USA) usando una fórmula publicada (Breustedt et al., 2006 Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764(2):161-173).

Las FIGS. 5A y B muestran que ambas variantes de Coversin, así como sus versiones PASiladas, retienen la actividad de unión a LTB₄, uniéndose a LTB₄ con una K_D en el intervalo picomolar.

Ejemplo 4: Análisis de la estabilidad térmica usando espectroscopia CD

Se usó el dicroísmo circular para detectar el desdoblamiento de la proteína como resultado de la desnaturalización térmica. Mediante este método, se obtuvo la temperatura de fusión de la Coversin de tipo salvaje y de las variantes 1 y 2 de la Coversin.

El desdoblamiento térmico se midió en un espectropolarímetro J-810 (Jasco, Tokio, Japón) equipado con un elemento Peltier PT-423S, ambos controlados por el software del instrumento Spectra Manager versión 1.53.05. Las soluciones de proteína se cambiaron con tampón a 20 mM KP_i pH 7,5, 50 mM K₂SO₄ mediante diálisis durante la noche a 4°C usando un dispositivo de mini diálisis Slide-A-Lyzer™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, Mass., USA) y se registraron los espectros a una concentración de proteína de 12,5 µM en una cubeta de cuarzo (longitud de paso de 1 mm; Hellma) a 20°C y a 94°C de 190 nm a 250 nm. De esta manera se identificó el cambio de señal óptimo para los estudios de desnaturalización a 217 nm. Las temperaturas de fusión (T_m) se determinaron con soluciones de proteínas tras calentarlas de 20°C a 94°C con un gradiente de 60 K/h. Los datos se registraron a 217 nm y se evaluaron

de acuerdo con el modelo de dos estados de plegamiento de proteínas usando una fórmula publicada (Schlehuber y Skerra, 2002 Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant-a so-called 'anticalin'-using a molecular random approach. Biophys Chem. 96(2-3):213-228) con el software KaleidaGraph (Synergy software, Reading, Pa., USA).

Se representó gráficamente la fracción de proteína desplegada frente a la temperatura para obtener las curvas de fusión de la Figura 6 y un valor para la temperatura de fusión de la Coversin de tipo salvaje y las variantes 1 y 2. Como se muestra en la Figura 6, la Coversin de tipo salvaje tiene una temperatura de fusión de $61,06^{\circ}\text{C} \pm 0,03^{\circ}\text{C}$, la variante 2 tiene una temperatura de fusión de $57,83^{\circ}\text{C} \pm 0,04^{\circ}\text{C}$, y la variante 1 tiene una temperatura de fusión de $50,16^{\circ}\text{C} \pm 0,06^{\circ}\text{C}$.

Ejemplos 5: Las variantes de la Coversin no demuestran actividad inhibidora de C5

Para evaluar los efectos inhibidores de las variantes 1 y 2 de la Coversin sobre C5, se realizó un ensayo CH50 con proteínas de Coversin purificadas usando el protocolo que se detalla a continuación.

Se sensibilizaron glóbulos rojos de oveja (SRBC) usando hemolisina de conejo (Sigma) de acuerdo con el método de Giclas et al. 1994. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 50 μl usando 25 μl de suero humano normal (NHS) agrupado diluido 1:80 en solución salina tamponada con veronal de gelatina suplementada con calcio y magnesio y 25 μl de SRBC sensibilizados. Todos los ensayos líticos se prepararon en hielo. Se prepararon diluciones en serie de Coversin, variante 1 de Coversin y variante 2 de Coversin en el NHS diluido. Los ensayos se incubaron durante 30 minutos a 37°C con agitación a 350 rpm. Las reacciones se detuvieron por microcentrifugación a 4000 g durante 5 segundos y el sobrenadante se retiró a una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 100 μl de ddH₂O a cada pocillo y se calculó el porcentaje de lisis en presencia de las proteínas como porcentaje de la lisis total inducida añadiendo 25 μl de agua a las reacciones en lugar del NHS diluido.

Se evaluó el efecto inhibidor de cada proteína sobre C5 mediante el porcentaje de lisis de células en presencia de cada una de las proteínas de Coversin. Se realizaron mediciones de la absorbancia como medida de la lisis celular a 405 nm a lo largo del intervalo de concentraciones de la proteína Coversin.

La Figura 7 muestra que el porcentaje de lisis celular en las muestras que contenían diferentes concentraciones de Coversin de tipo salvaje se mantuvo por debajo del 10% en cada concentración, lo que demuestra el efecto inhibidor de C5 conocido por parte de la Coversin de tipo salvaje. Por el contrario, casi todas las células de las muestras que contenían ambas variantes de Coversin a diferentes concentraciones fueron lisadas, lo que indica que ninguna de las variantes posee actividad inhibidora detectable hacia el C5.

Ejemplo 6: La L-Coversin reduce el infiltrado de granulocitos en modelos de asma en ratones HDM

Para probar el efecto de las variantes de la Coversin in vivo, se introdujo la variante 2 en un modelo de ratón de asma, inducido por un alérgeno de ácaros del polvo doméstico (HDM) (consultar Gregory, L. G., et al., 2009). Los seis grupos de ratones se probaron como se describe a continuación:

1. PBS (n=4)
2. L-Coversin (n=4)
3. HDM (n=6)
4. HDM/L-Coversin (n=6)

Se administraron 25 μg de HDM por vía intratraqueal (i.t.) a grupos de 4-6 ratones en 50 μl de PBS 3 veces a la semana durante 3 semanas. Se administraron 100 μg de L-Coversin en 50 μl de PBS diariamente durante 3 semanas. Se administró PBS con el mismo régimen de dosificación al control (grupo 1).

A continuación, se analizaron los niveles de eosinófilos y neutrófilos en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) de cada grupo. Los resultados se muestran en la Figura 8. En la Figura 8 se muestra que la L-Coversin provoca una reducción significativa del número de neutrófilos y una reducción casi significativa del número de eosinófilos en el líquido de lavado broncoalveolar con respecto al control de HDM solo.

Ejemplo 7: L-Coversin PASilada en el Modelo de Transferencia EBA

La epidermólisis bullosa adquirida (EBA) por transferencia de anticuerpos se indujo usando una versión modificada del protocolo descrito por Sitaru et al., 2005. Brevemente, se inyectaron a los ratones por vía subcutánea 50 μg de IgG anti-Col7 purificada por afinidad en los días 0, 2 y 4. Se inyectó a los ratones por vía subcutánea dos veces al día con Coversin o L-Coversin PASilada (variante 2 PASilada) comenzando cuatro días antes de la primera inyección de IgG anti-Col7 (día -2). Esta aplicación se continuó durante todo el experimento hasta su último día, el día 11. En los grupos de control, los ratones recibieron únicamente el vehículo por vía subcutánea.

Para generar anticuerpos dirigidos contra el colágeno murino de tipo VII ("anti-COL7"), se inmunizó a conejos blancos de Nueva Zelanda con 200 µg de una mezcla proteica que contenía tres proteínas recombinantes diferentes ("Col7A, B y C") derivadas del dominio no colágeno 1 (NC1) del colágeno VII junto con adyuvante incompleto de Freund. Las IgG se aislaron del suero de conejos inmunizados usando proteína G, y posteriormente las IgG se purificaron por afinidad con his-Col7 para obtener específicamente IgG anti-Col7 de conejo. Se comprobó la calidad de los anticuerpos determinando el título y la potencia en el ensayo de criosección.

Comenzando el día 4, se puntuó la extensión de las lesiones cutáneas en cada ratón cada dos días. Las áreas de la piel que presentaban eritema, ampollas, erosiones, costras o alopecia fueron clasificadas como "afectadas" o "no afectadas" por un observador entrenado [Sitaru et al., 2005]. Se calculó el porcentaje de la superficie corporal total afectada por lesiones cutáneas (ABSA).

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 9. Puede observarse que se redujo el porcentaje de ABSA en ratones tratados con Coversin a 2,5 mg/kg, y que también se redujo el ABSA en ratones tratados con la variante 2 de L-Coversin PASilada a 10 mg/kg. La secuencia PAS-L-Coversin usada fue la variante 2 con una secuencia PAS fusionada al extremo N-terminal. Debido al mayor peso molecular de la PAS-L-Cov, 10 mg/kg de PAS-L-Cov corresponden a 2,5 mg/kg de Coversin.

Referencias

- Aya, I. (2006) Blockade of leukotriene B4 signalling pathway directly inhibits cell proliferation and induces apoptosis colon cancer, Yokohama Medical Journal 57, 43-52.
- Ausubel, F. M., Davis, K. R., Schott, E. J., Dong, X., and Mindrinos, M. (1991) Identification of signal transduction pathways leading to the expression of *Arabidopsis thaliana* defense genes, Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions 1: 357-364.
- Barratt-Due, A., Thorgersen, E. B., Lindstad, J. K., Pharo, A., Lissina, O., Lambris, J. D., Nunn, M. A., Mollnes, T. E. (2011) *Ornithodoros moubata* complement inhibitor is an equally effective C5 inhibitor in pigs and humans. J Immunol. 187(9):4913-9
- Bisgaard H., Groth S., and Madsen F. (1985). Bronchial hyperreactivity to leukotriene D4 and histamine in exogenous asthma. Br Med J. 290, 1468-1471.
- Chen, M., Lam, B. K., Kanaoka, Y., Nigrovic, P. A., Audoly, L. P., Austen, K. F. and Lee D. M. (2006). Neutrophil derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. J. Exp. Med. 203, 837-842.
- Curry, S. L., Cogar, S. M. and Cook, J. L. (2005). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: A Review. Journal of the American Animal Hospital Association 41, 298-309.
- Curtis-Prior, P. (ed.) The Eicosanoids. John Wiley & Sons. ISBN 0471 1489840.
- Czarnetzki, B. (1983). Increased monocyte chemotaxis towards leukotriene B4 and platelet activating factor in patients with inflammatory dermatoses. Clin Exp Immunol. 54, 486-492.
- Del Prete A., Shao W. H., Mitola S., Santoro G., Sozzani S., and Haribabu, B. (2007) Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. Blood, 109, 626-631.
- Drazen J. M. (1988). Comparative contractile responses to sulfidopeptide leukotrienes in normal and asthmatic human subjects. Ann NY Acad Sci. 524, 289-297.
- Dube L. M., Swanson L. J., Awani W. M., Bell R. L., Carter G. W., Ochs R. F. (1998). Zileuton: the first leukotriene inhibitor for use in the management of chronic asthma. In: Drazen J M, Dahlen S, Lee T H, eds. Five-lipoxygenase Products in Asthma. New York, N.Y.: Marcel Dekkar, Inc.
- Fernandez, J., and Hoeffler, J. Gene Expression System: Using Nature for the Art of Expression, 1998
- Ford-Hutchinson, A. (1990). Leukotriene B4 in inflammation. Crit. Rev. Immunol. 10, 1-12.
- Giclas, P. C. (1994). Classical and alternative pathway evaluation (sections 13.1 and 13.2). In Current Protocols in Immunology, Vol. 3, Complement. Editors: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober. Series editor: R. Coico. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Gregory, L. G., et al., Inhaled house dust mite induces pulmonary T helper 2 cytokine production. Clin Exp Allergy, 2009. 39(10): p. 1597-610.
- Hao C M. and Breyer M. D. (2007). Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. Kidney International 71, 1105-1115.
- Harrison, K. A., Murphy, R. C. (1995). Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 270, 17273-17276.
- Hepburn, N. J., Williams, A. S., Nunn, M. A., Chamberlain-Banoub, J. C., Hamer, J., Morgan, B. P. and Harris, C L. (2007) In vivo characterisation and therapeutic efficacy of C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. J Biol Chem. 282, 8292-8299.
- Hoover, H., Karnovsky, M., Austen, K., Corey, E. and Lewis, R. (1984). Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81, 2191-2193.
- Imig, J. D. (2000). Eicosanoid regulation of the renal vasculature. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 279, F965-F981.
- Jore, M. M. et al (2016) Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5, Nature Structural & Molecular Biology 23, 378-386
- Klaas P J. M. van Gisbergen, Marta Sanchez-Hernandez, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette van Kooyk (2005)

Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 201, 1281-1292.

Kim, N. D., Chou, R. C., Seung, E., Tager, A. M. and Luster, A. D. (2006). A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203, 829-835.

Kim, N. D. and Luster, A. D. (2007) Regulation of immune cells by eicosanoid receptors, *The Scientific World Journal* 7, 1307-1328.

Lundeen K. A., Sun B., Karlsson L., and Fourie A. M. (2006) Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J. Immunol.* 177, 3439-3447.

Miyahara, N., Miyahara, S., Takeda, K., and Gelfand G. W. (2006). Role of the LTB4/BLT1 Pathway in Allergen-induced Airway Hyperresponsiveness and Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 55, 91-7.

Noiri, E., Yokomizo, T., Kakao, A., Izumi, T., Fujita, T., Kimura, S., and Shimizu, T. (2000). An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B(4) in acute renal ischaemic-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 823-828.

Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., & Nuttall, P. A. (2005) Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata* J. *Immunol.* 174, 2084-2091. Paesen G C, Adams P L, Harlos K, Nuttall P A, Stuart D I. (1999) Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell* 3, 661-671.

Peters-Golden, M. & Henderson Jr., W. R. (2007). Leukotrienes. *N. Eng. J. Med.* 357, 1841-1854.

Powell W. S., and Rokach J. (2005) Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-ETE. *Prog Lipid Res.* 44, 154-183.

Remington, J. P. (1991) Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Pub. Co.

Roversi, P. R., Lissina, O., Johnson, S., Ahmat, N., Paesen, G. C., Ploss, K., Boland, W., Nunn, M. A., and Lea, S. R. (2007) The structure of OmCI a novel lipocalin inhibitor of the complement system. *J. Mol. Biol.* 369:784-93.

Roversi, P., Ryffel, B., Togbe, D., Maillet, I., Teixeira, M., Ahmat, N., Paesen, G., Lissina, O., Boland, W., Ploss, K., Caesar, J., Leonhartsberger, S., Lea, S., and Nunn, M. (2013) Bifunctional Lipocalin Ameliorates Murine Immune Complex-induced Acute Lung Injury. *J. Biol. Chem* 288: 18789-18802

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual

Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 569-575.

Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26: 489-501

Schwartz, G. K., Weitzman, A., O'Reilly, E., Brail, L., de Alwis, D. P., Cleverly, A., Barile-Thiem, B., Vinciguerra, V., and Budman D. R. (2005) Phase I and Pharmacokinetic Study of LY293111, an Orally Bioavailable LTB4 Receptor Antagonist, in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 5365-5373.

Sebaldt, R. J., Sheller, J. R., Oates, J. A., Roberts, L. J. and FitzGerald G. A. (1990). Inhibition of eicosanoid biosynthesis by glucocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 8, 6974-6978.

Shao W. H., Del Prete A., Bock C. B., Haribabu B. (2006) Targeted Disruption of Leukotriene B4 Receptors BLT1 and BLT2: A Critical Role for BLT1 in Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J. Immunol.* 176, 6254-6261.

Sharma, J. N. and Mohammed, L. A. (2006). The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Immunopharmacology* 14, 10-16.

Showell, H. J., Pettipher, E. R., Cheng, J. B., Breslow, R., Conklyn, M., Farrell, C A, Hingorani, G. P., Salter, E. D., Hackman, B. C., Wimberly, D J. et al (1995). The in vitro and in vivo pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B4 receptor antagonist CP-105696. *J. Pharm. Exp. Ther.* 273, 176-184.

Sitaru, C., et al. Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen *J Clin Invest* 2005; 115:870-8.

Spector, D. L., Goldman, R. D., Leinwand, L. A. (1998) Cells: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tager, A. M. and Luster, A. D. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69, 123-134.

Taube C, Miyahara N., Ott V., Swanson B., Takeda K., Loader J., Shultz L. D., Tager A. M., Luster A. D., Dakhama A., and Gelfand E. W. (2006) The leukotriene B4 receptor BLT1 is required for effector CD8+ T cell-mediated, mast cell-dependent airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 176, 3157-3164.

Yamaoka, K A., Claesson, H. E., and Rosen, A. (1989) Leukotriene B4 enhances activation, proliferation, and differentiation of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 143, 1996-2000.

Yokomizo, T., Kato, K., Higiyama, H., Izumi, T. and Shimizu, T. (1997). A G-protein coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620-624.

Yokomizo, T., Kato, K., Terwaki, K., Y., Izumi, T. and Shimizu, T. (2000). A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* 192, 421-432.

Yokomizo, T., Isumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., Shimizu, T. (2001). Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor BLT2. *J. Biol. Chem.* 276, 12454-12459.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de Coversin modificado que presenta actividad de unión a leucotrienos o hidroxiieicosanoides y unión a C5 reducida o ausente, dicho polipéptido de Coversin modificado comprendiendo la SEQ ID NO: 3 en la que se realizan hasta 30 sustituciones de aminoácidos, en donde

(i) en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 se realizan las siguientes sustituciones (a)-(e):

- a. Met116 se sustituye por Gln, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala, Pro, His o Thr;
- b. Leu117 se sustituye por Ser, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Gly, Ala o Pro;
- c. Gly121 se sustituye por Ala, Asp, Asn, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro o His;
- d. Leu122 se sustituye por Asp, Glu, Asn, Ala, Gln, Arg, Lys, Pro, o Su; y
- e. Glu123 se sustituye por Ala, Asp, Gln, Asn, Arg, Lys, Gly, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr; y en donde

(ii) Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, Lys, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, Pro, o His; y en donde

(iii) Asp149 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly, Gln, Asn, Ala, Met, Arg, Lys, Leu, Ser, Ile, Phe, Tyr, Pro, His o Thr, y en donde

(iv) Met114, Trp115, Asp118, Ala119, Gly120 y Val124 no están sustituidos,

o un fragmento del mismo en el que se eliminan hasta cinco aminoácidos del extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado.

2. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la reivindicación 1, o un fragmento del mismo, em donde en las posiciones 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3:

- a. Met116 se sustituye por Gln;
- b. Leu117 se sustituye por Ser;
- c. Gly121 se sustituye por Ala;
- d. Leu122 se sustituye por Asp; y
- e. Glu123 se sustituye por Ala.

3. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o un fragmento del mismo que tiene una secuencia de giro entre las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de SEQ ID NO:3 como se expone en la SEQ ID NO:11.

4. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con la reivindicación 3, o un fragmento del mismo que tiene 1-20 sustituciones adicionales en comparación con la SEQ ID NO:3 más allá de las que se exponen en la SEQ ID NO:6, opcionalmente:

- (i) que tiene de 2 a 15 sustituciones adicionales en comparación con la SEQ ID NO:3 además de las que se exponen en la SEQ ID NO:6; o
- (ii) que tiene de 3 a 10 sustituciones adicionales en comparación con la SEQ ID NO:3 además de las que se exponen en la SEQ ID NO:6.

5. El polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste en o comprende la SEQ ID NO:6.

6. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un fragmento del mismo, en donde:

- (i) Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn;
- (ii) Ala44 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Asn y Asp149 en la SEQ ID NO: 3 se sustituye por Gly;
- (iii) los seis aminoácidos de cisteína en las posiciones 6, 38, 100, 128, 129, 150 de la SEQ ID NO: 3 se conservan en forma no modificada;
- (iv) Asn60 y Asn84 se sustituyen cada uno por Gln;
- (v) uno o más, o todos, de los siguientes aminoácidos no están sustituidos: Phe18, Tyr25, Arg36, Leu39, Gly41, Pro43, Leu52, Val54, Met56, Phe58, Thr67, Trp69, Phe71, Gln87, Arg89, His99, His101 y Asp103;
- (vi) ninguno de los aminoácidos 5, 6, 11, 13-15, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 69-81, 83, 84, 86, 90-94, 97-104, 112-113, 125-129, 132-139, 145, 148, y 150 en la SEQ ID NO:3 están sustituidos;
- (vii) ninguno de los aminoácidos 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-27, 29-32, 35-41, 43, 45, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 97-104, 112-113, 125-129, 132-139, 145, 148 y 150 en la SEQ ID NO:3 están sustituidos; y/o
- (viii) ninguno de los aminoácidos 5, 6, 11, 13-15, 18, 20-21, 24-25, 27, 30-32, 35-41, 43, 47-48, 50, 52-60, 64, 66, 67, 69-81, 83, 84, 86, 87, 89, 90-94, 98, 100, 102-104, 112-113, 126, 128-129, 132-139, 145, 148 y 150 en la SEQ

ID NO:3 están sustituidos.

7. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores o un fragmento del mismo que se une a LTB₄.
8. Una proteína de fusión que comprende un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que está fusionado genética o químicamente con uno o más péptidos o polipéptidos, opcionalmente:
 - (i) que comprende una secuencia PAS; o
 - (ii) que comprende una secuencia PAS que consiste en 30 copias de la SEQ ID NO: 13, fusionada al extremo N terminal del polipéptido de Coversin modificado.
9. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de Coversin modificado o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o un vector de acuerdo con la reivindicación 8.
12. Un método para preparar un polipéptido de Coversin modificado o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones por las que se expresa dicha proteína y recuperar dicha proteína producida de este modo.
13. Una composición que comprende un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o la composición de la reivindicación 13 para su uso en terapia.
15. Un polipéptido de Coversin modificado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 8, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o la composición de la reivindicación 13 para su uso en un método de tratamiento del asma.

FIG. 1A

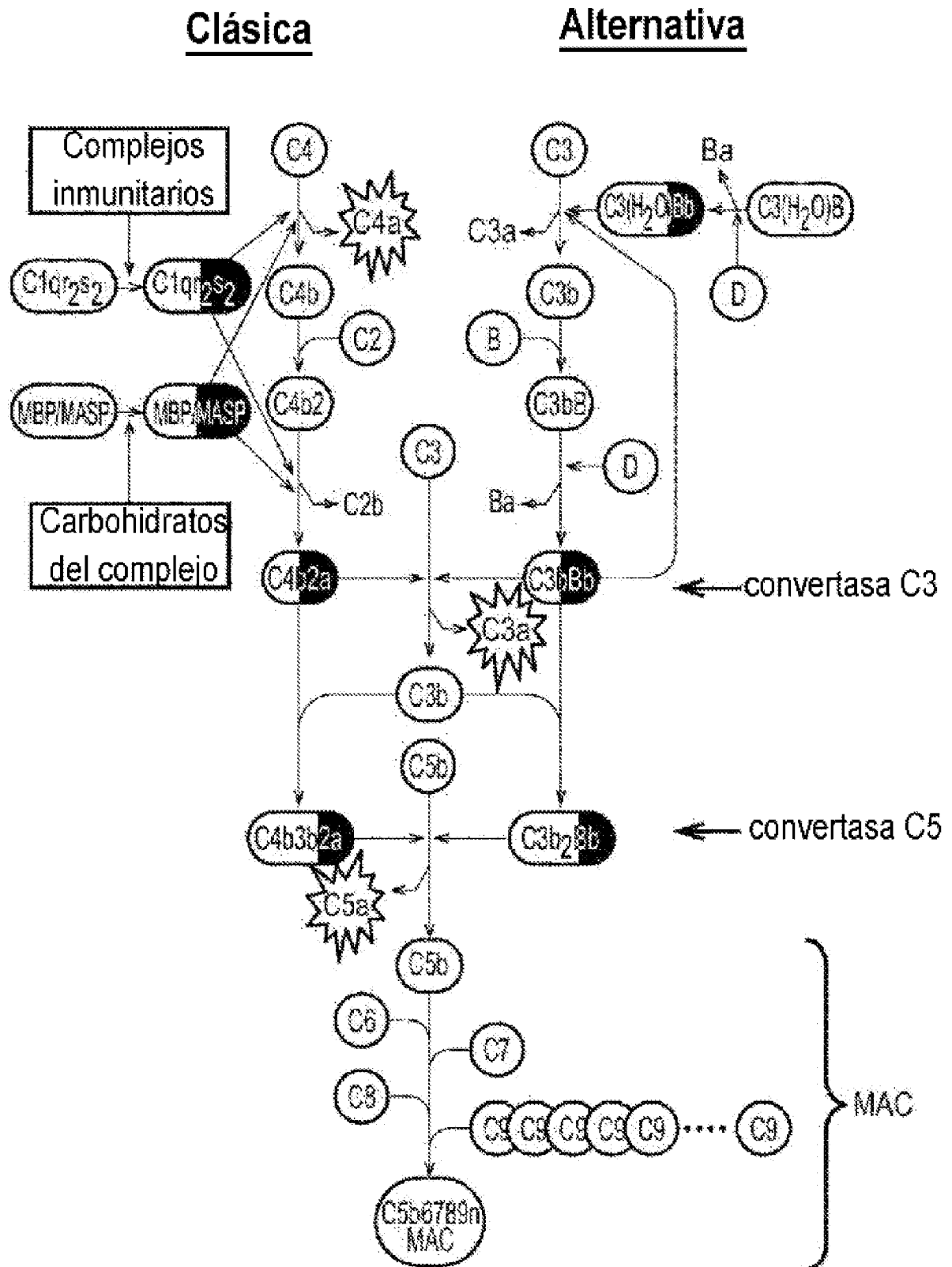


FIG. 1B

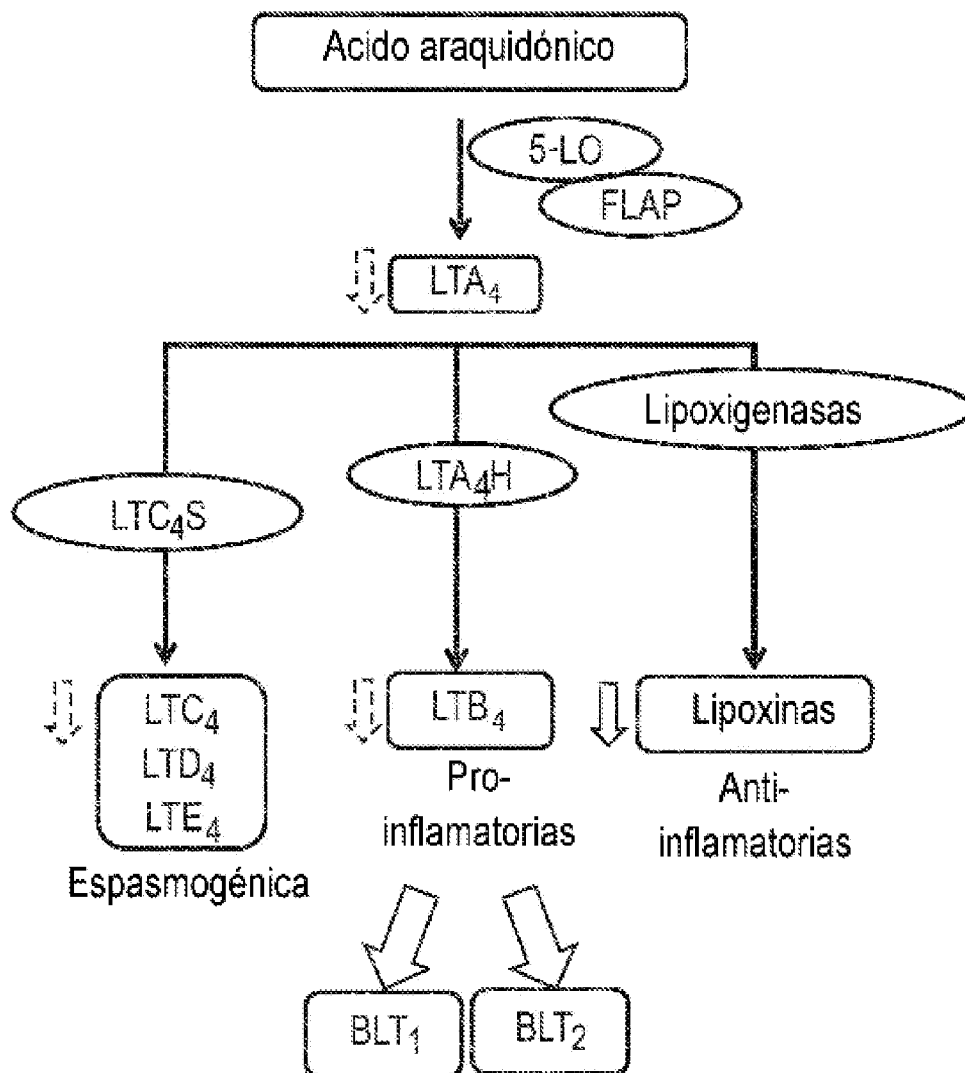


FIG. 2A

ATGCTGTTTGGTGACCCCTGATTTCTCTCTCTGCGAACATCGCATATGCTGACAGC 60
M L V L V T L I F S F S A N I A X A D S 20
 GAAAGCGACTGCACTGGAAGCGAACCTGTTCAGCGCCTTCCAAAGCTTTCAGTGAGGGCAA 120
 E S D C T G S E P V D A P Q A P S E G K 40
 GAGGCATATGTCCTGCTGAGGTCCACGGATCCCAAGCGAGGAGCTGCTTGAAAGGAGAA 180
 E A Y V L V R S T D P K A R D C L K G E 60
 CCAGCCGGAGADAAGCAGGACAACACGTTGCCGTTGATGATGACGTTTAAGAATGCCACA 240
 P A G E K Q D N T L P V M M T F K N G T 80
 GACTGGGCTTCAACCGATTGGACGTTTACTTTCGACGGCGCAAGGTAACGGCAACCCCTT 300
 D W A S T D W T F T L D G A K V T A T L 100
 GGTAACTTAAACCAATAAGGARGTGGTCTACGACTCGCAAGTCAATCCTGCCACGTT 360
 G N L T Q N R E V V Y D S Q S H H C H V 120
 GACAAGGTCGAGAAGGAAGTTCAGATTATGAGATGTGGATGCTCGATGCGGAGGGCTT 420
 D K V E K E V P D Y E M W M L D A G G L 140
 GAAGTGGAAAGTCGAGTGCTGCCGTCAAAAGCTTGAAGAGTTGGCGTCTGGCAGGAACCAA 480
 E V E V E C C R Q K L E E L A S G R N Q 160
 ATGTATCCCCATCTCAAGGACTGCTAG 507
 M Y P H L K D C * 168

FIG. 2B

Mutante 1 SEQ ID NO:5 (150 aminoácidos)

```
daesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepagekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkeveevp dyeqwqsngs addkeveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
```

MUTANTE 2 SEQ ID NO:6 (150 aminoácidos)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkeveevp dyemwqsdag adaveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc
```

MUTANTE 3 SEQ ID NO:7 (150 aminoácidos)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkeveevp dyemwqldag gdeveveccr qkleelasgr nqmyphlkgc
```

MUTANTE 4 SEQ ID NO:8 (150 aminoácidos)

```
dsesdctgse pvdafqafse gkeayvlvrs tdpkardclk gepngekqdn
tlpvmmtfkn gtdwastdwt ftldgakvta tlgnltqnre vvydsqshhc
hvdkeveevp dyemwmldag gleveveccr qkleelasgr nqmyphlkdc
```

SEQ ID NO: 9 (11 aminoácidos) de las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 y 132-142 de la SEQ ID NO: 2

mwmldagglev

SEQ ID NO: 10 (11 aminoácidos) de las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 1 de Coversin (SEQ ID NO: 5).

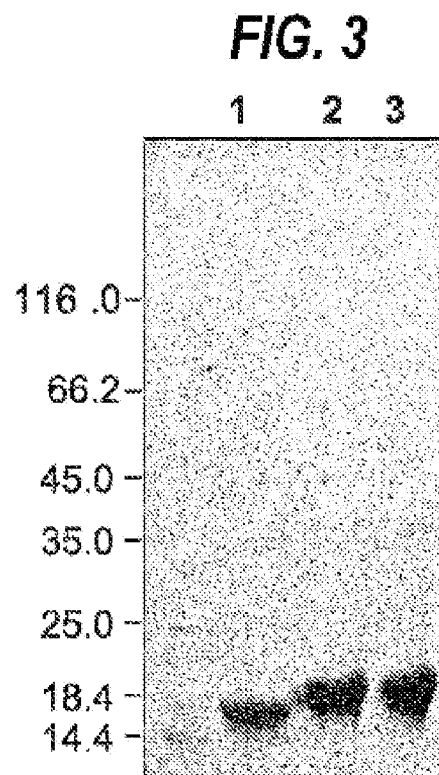
qwqsngsaddk

SEQ ID NO: 11 (11 aminoácidos) de las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 2 de Coversin (SEQ ID NO: 6)).

mwqsdagadav

SEQ ID NO: 12 (11 aminoácidos) de las posiciones de aminoácidos 114 a 124 de la SEQ ID NO: 3 en la variante 3 de Coversin (SEQ ID NO: 7)).

mwqldaggdev



1: Conversin wt, reducida

2: variante 1 de Conversin, reducida

3: variante 2 de Conversin, reducida

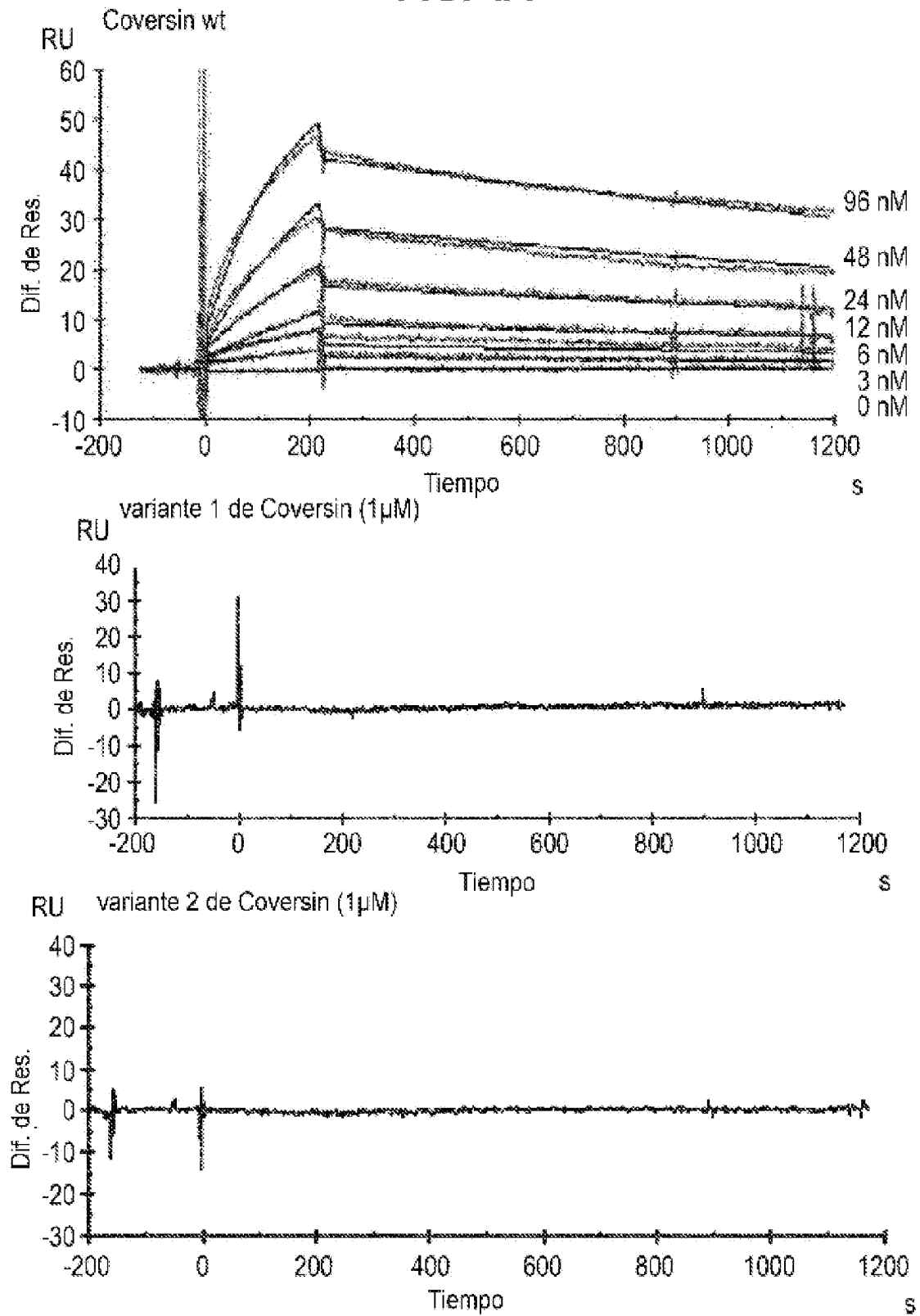
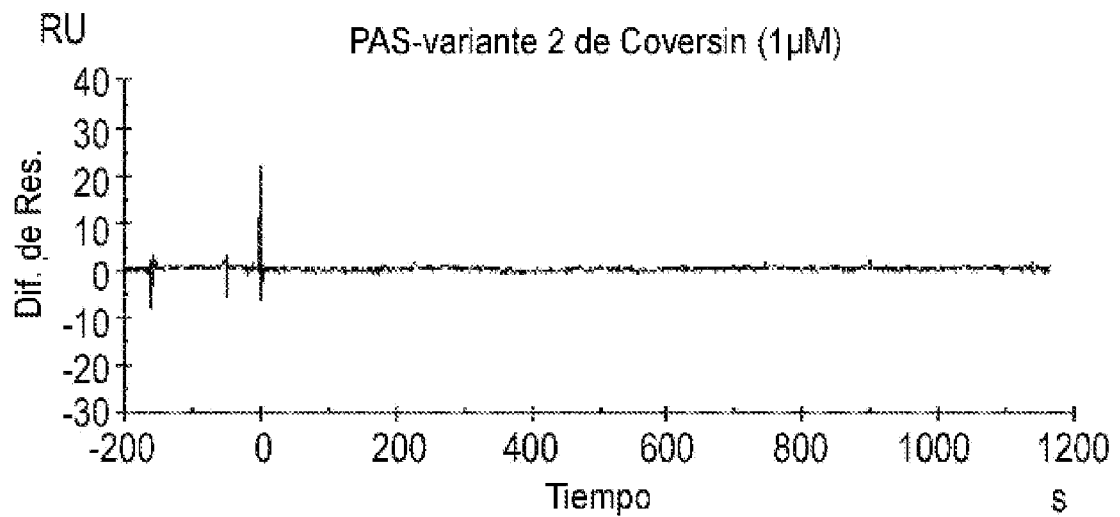
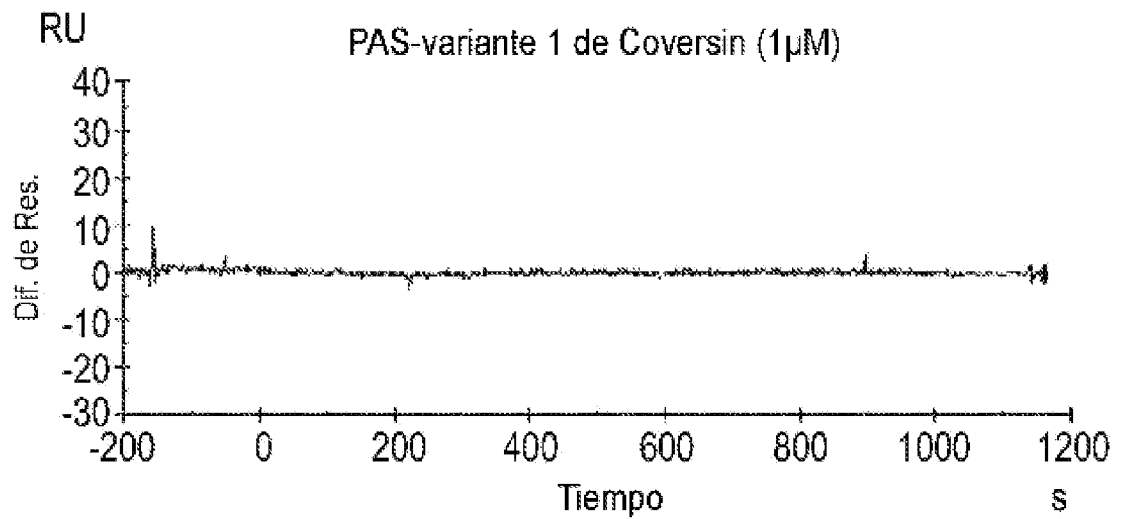
FIG. 4A

FIG. 4B



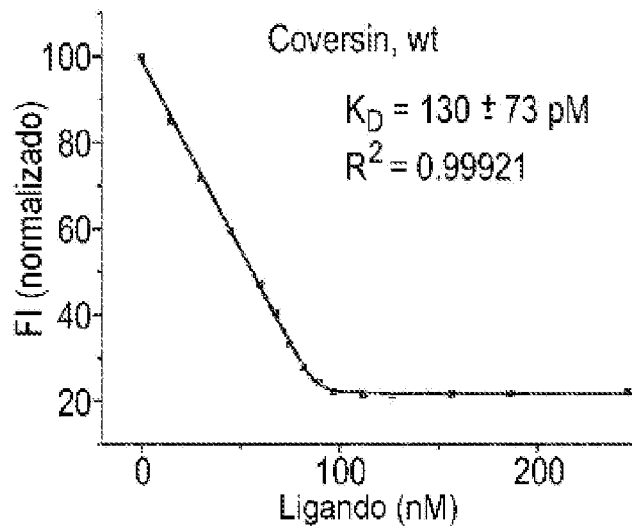


FIG. 5A

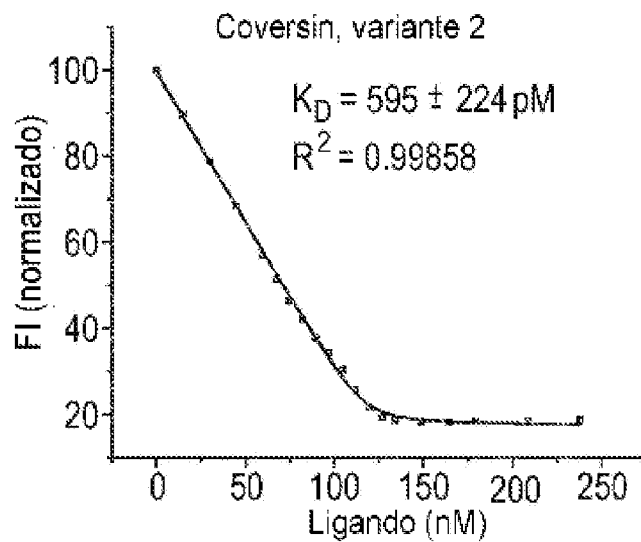
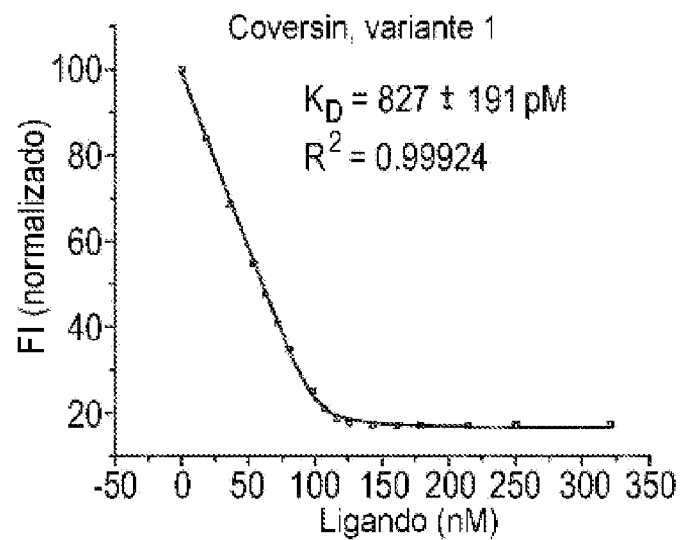
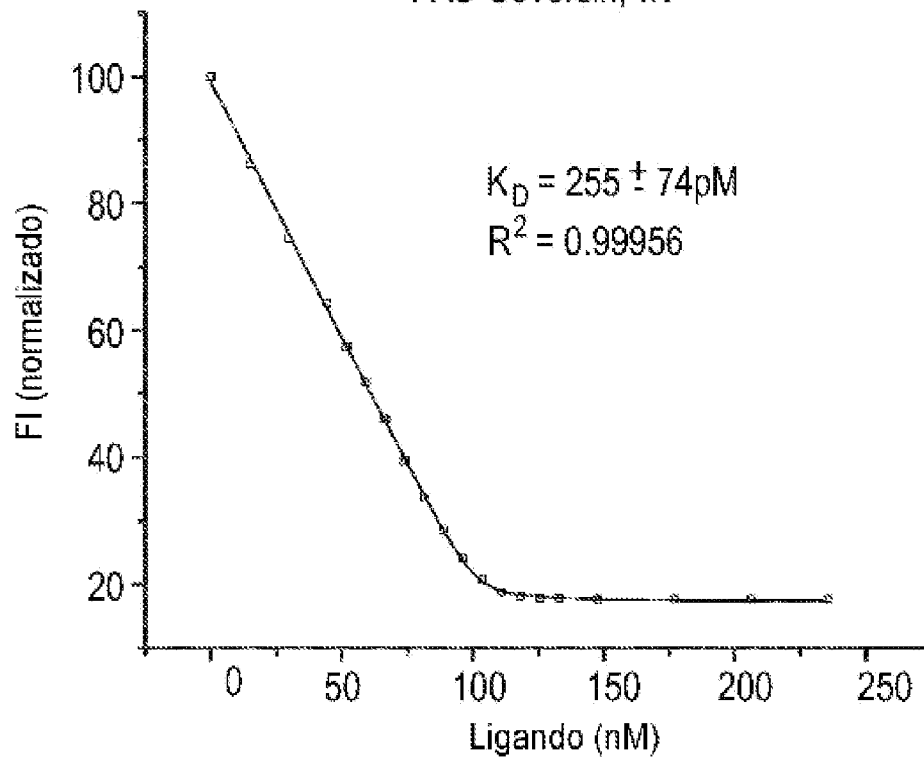


FIG. 5B

PAS-Coversin, wt



PAS-Coversin, variante 2

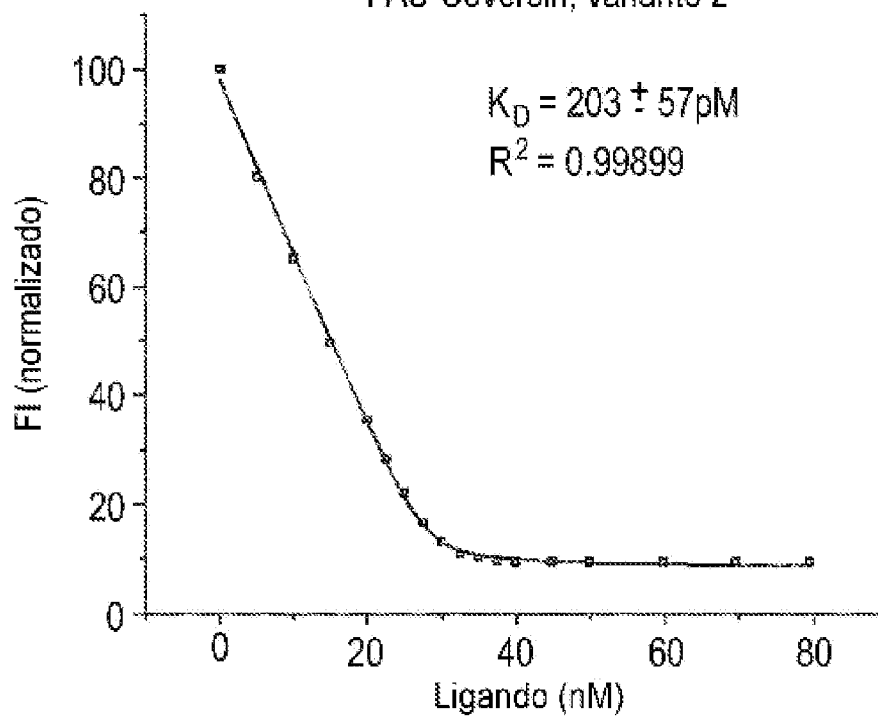


FIG. 5B (cont.)

PAS-Coversin, variante 1

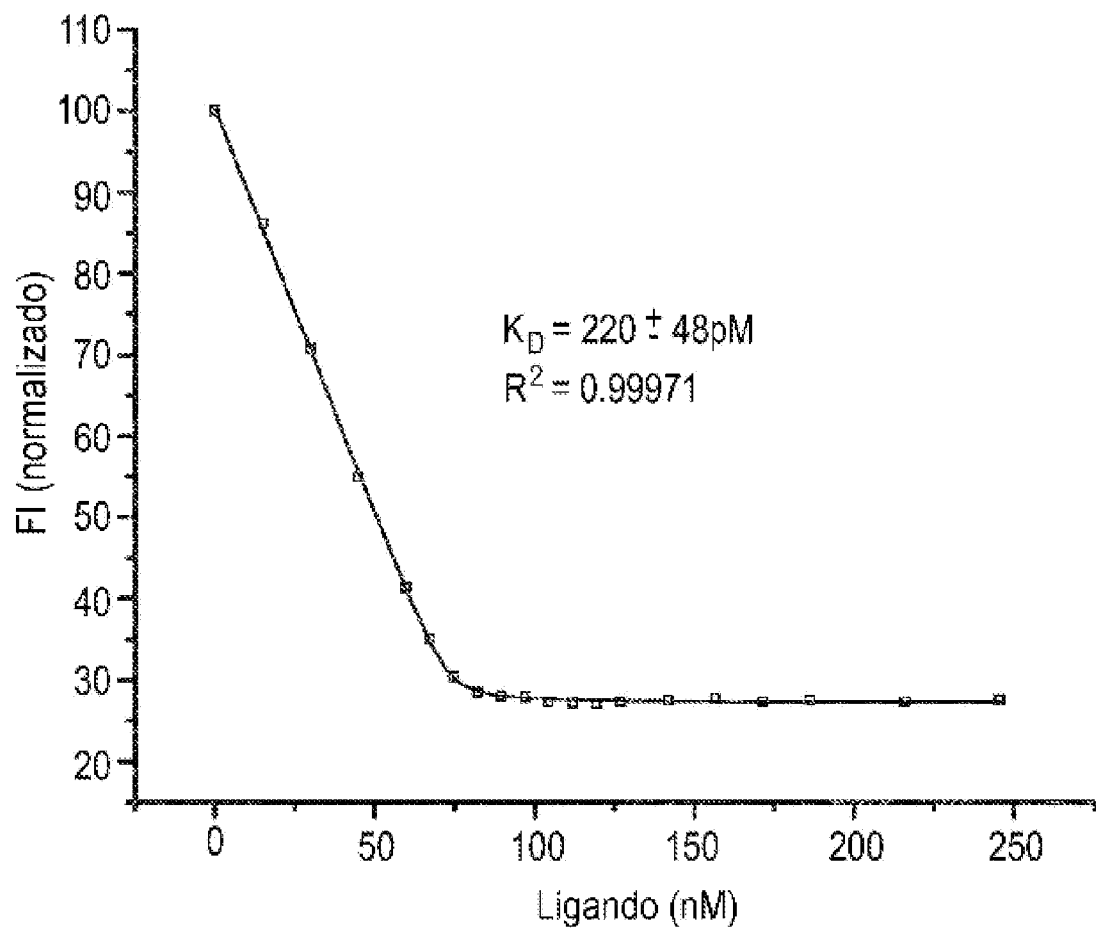
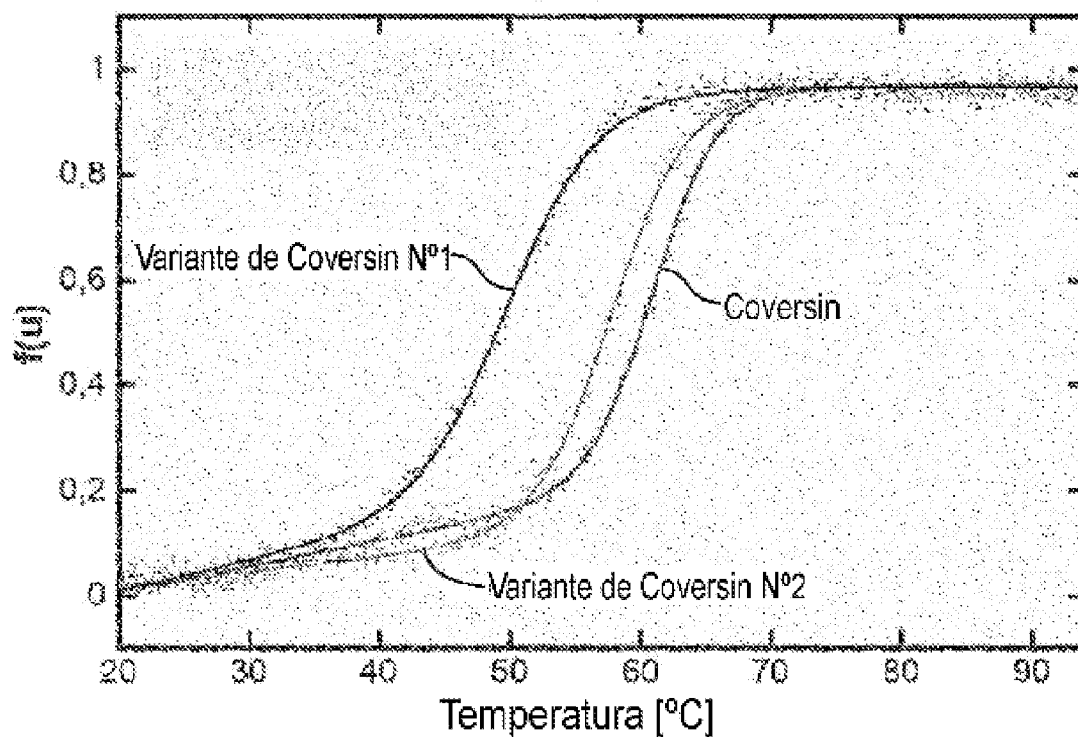


FIG. 6

	Temperatura de fusión [°C]
Coversin	61.06 ± 0.03
Coversin variante 2	57.83 ± 0.04
Coversin variante 1	50.16 ± 0.06

FIG. 7

Porcentaje de lisis de SRCB en presencia de L-Cov1, L-Cov2y Coversin

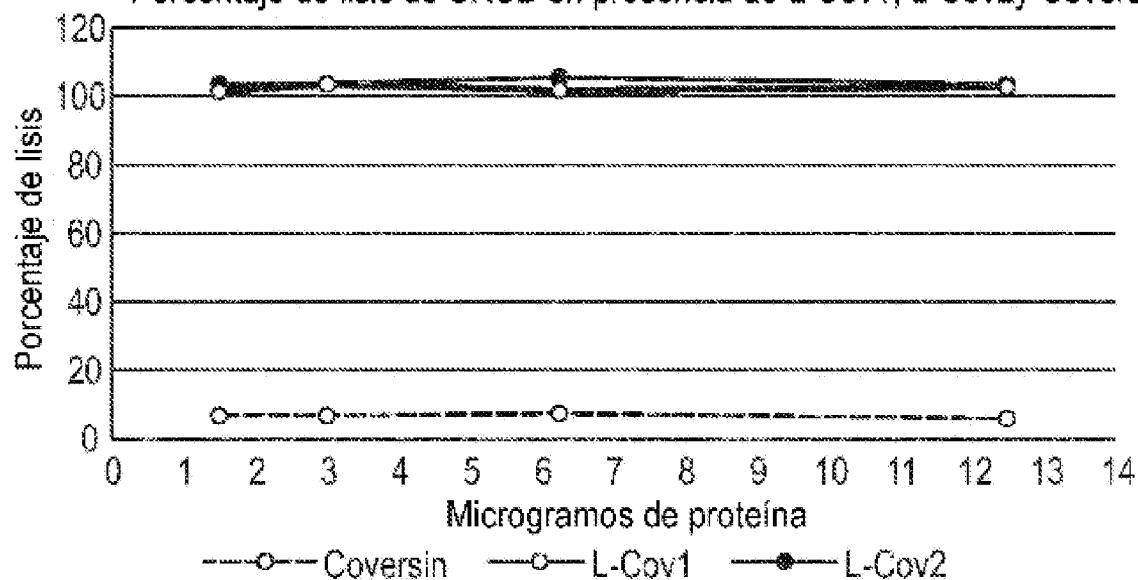


FIG. 8

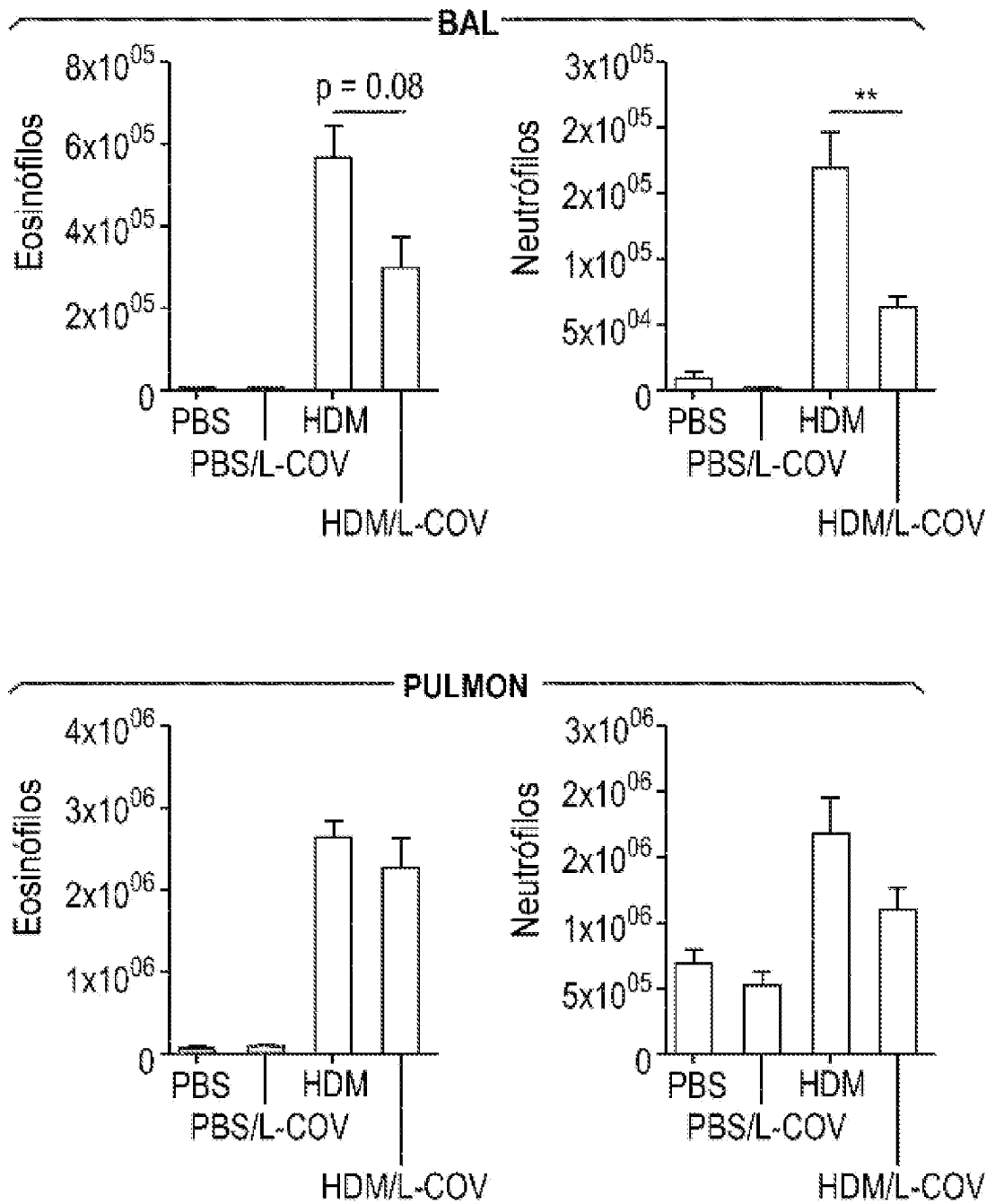


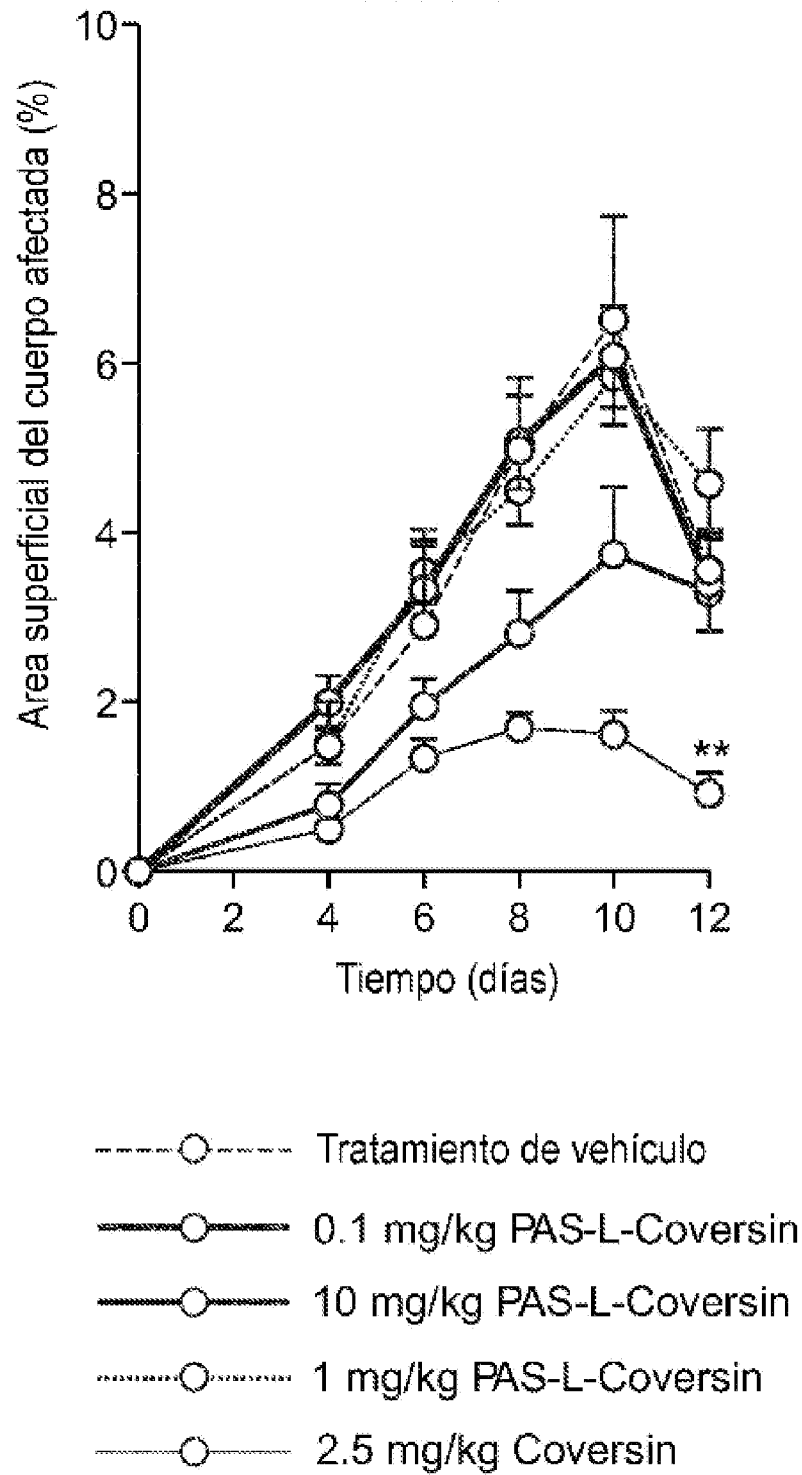
FIG. 9A

FIG. 9B