(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 800 599**

(51) Int. CI.:

C07K 14/315 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2014 PCT/GB2014/053072**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055991**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2014 E 14789350 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3057979**

(54) Título: **Proteínas con usos de diagnóstico y terapéutico**

(30) Prioridad:

14.10.2013 GB 201318170

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.01.2021

(73) Titular/es:

THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF EDINBURGH (100.0%)
Old College, South Bridge
Edinburgh Midlothian EH8 9YL, GB

(72) Inventor/es:

HERBERT, ANDREW PETER;
BARLOW, PAUL y
MAKOU, ELISAVET

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Proteínas con usos de diagnóstico y terapéutico

La presente invención se refiere a proteínas capaces de interactuar con el factor H del complemento y modular su actividad. La invención también se refiere a métodos de uso de tales proteínas en terapéutica, diagnóstico y otras aplicaciones.

Antecedentes de la invención

El sistema del complemento es un conjunto de 40-50 proteínas en la sangre que proporciona una primera línea de defensa contra la infección. Un sistema del complemento regulado incorrectamente puede dañar el huésped o las células propias, así como las bacterianas. De este modo, puede causar o exacerbar los síntomas de muchas enfermedades. En consecuencia, hay mucho interés en desarrollar reactivos que controlen o modulen las proteínas del sistema del complemento.

El factor H del complemento humano (CFH) es una proteína que actúa selectivamente sobre las autosuperficies para protegerlas del daño mediado por el sistema del complemento. Todavía, muchos patógenos pueden explotar el CFH del huésped para sus propios fines. Estudiar cómo CFH (que consta de 20 módulos de proteína de control del complemento (CCP), también conocidos como repeticiones de consenso cortas (SCR) o dominios de sushi) interactúa con las proteínas microbianas relevantes ha proporcionado pistas sobre cómo se puede capturar CFH y su actividad modulada por polipéptidos producidos en el laboratorio.

La PspC es una de las cuatro designaciones para una proteína de superficie neumocócica cuyo gen está presente en aproximadamente el 75% de todas las cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Bajo el nombre de SpsA, se ha demostrado que la proteína se une a la inmunoglobulina secretora A (S. Hammerschmidt, S. R. Talay, P. Brandtzaeg, and G. S. Chhatwal, Mol. Microbiol. 25:1113-1124, 1997). Bajo el nombre de CbpA, se ha demostrado que la proteína interactúa con células epiteliales y endoteliales humanas (C. Rosenow et al., Mol. Microbiol. 25:819-829, 1997). El gen es paralogo al gen PspA en *S. pneumoniae* y por eso se le llamó PspC (A. Brooks-Walter, R. C. Tart, D. E. Briles, and S. K. Hollingshead, Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology 1997). Bajo el nombre HIC, se ha demostrado que la proteína interactúa con el factor H humano (Janulczyk R., Iannelli F., Sjoholm A.G., Pozzi G., Bjorck L. J. Biol. Chem. 275:37257-37263,2000). Se proporciona una descripción detallada de PspC en Brooks-Walter et al., "The pspC Gene of *Streptococcus pneumoniae* Encodes a Polymorphic Protein, PspC, Which Elicits Cross-Reactive Antibodies to PspA and Provides Immunity to Pneumococcal Bacteremia" Infect Immun. 1999 December; 67(12): 6533-6542. PMCID: PMC97064. En la secuencia de este artículo, las comparaciones de cinco alelos publicados y siete nuevos alelos revelan que este gen tiene una estructura de mosaico y que los dominios modulares han contribuido a la diversidad genética durante la evolución. Existen dos clados principales: los alelos del clado A son más grandes y contienen un módulo adicional que se comparte con muchos alelos de PspA; Los alelos del clado B son más pequeños y carecen de este dominio similar a PspA. Todos los alelos tienen un dominio rico en prolina y un dominio repetido de unión a colina que muestra 0% de divergencia de dominios similares en la proteína PspA.

Los presentes inventores produjeron un truncamiento de PspC de *Streptococcus pneumoniae* (PspCN) que se une a CFH de forma irreversible (en la escala de tiempo biológica) principalmente a través de interacciones con CCP 8-10. El CFH capturado con PspCN adopta una conformación en la que un reticulante químico se puede unir a su CCP 5 y CCP 18, así como a su CCP 7 y CCP 20; Es interesante que las CCP 7 y 20 median en el reconocimiento de la autosuperficie y son sitios de unión doble para muchas otras bacterias que interactúan con el CFH.

En experimentos realizados usando resonancia de plasmón superficial, se encontró que el complejo PspCN:CFH se unía al menos tres veces mejor que CFH a C3b inmovilizada, la versión activada del componente C3 del complemento. El complejo PspCN:CFH se unió muchas veces mejor que CFH al fragmento C3b proteolítico, C3d. El complejo PspCN:CFH disocia la convertasa C3, C3b.Bb (la enzima que divide C3 en C3a y C3b) hasta diez veces más de manera eficaz que el CFH. Estas observaciones se atribuyeron especulativamente a la exposición tras la formación compleja de un sitio de interacción con la superficie ocluida y de unión a C3d/C3b dentro de las CCP 19-20 de CFH.

En apoyo de esta noción, se descubrió que CFH (D1119G), que carece de un residuo crítico dentro de la interfaz C3d/C3b:CCP 19 y está relacionado con el síndrome urémico hemolítico atípico de la enfermedad renal, unido a C3b inmovilizada en un chip de resonancia de plasmón superficial y C3b.Bb inmovilizada deteriorada de forma similar, tan de manera eficaz como CFH (tipo salvaje); sin embargo, este mutante no previno la hemólisis mediada por el complemento de los eritrocitos portadores de ácido siálico, lo que implica que las CCP 19-20 se usan para la acción reguladora de CFH en las autosuperficies a pesar de que no contribuyen a la unión de C3b en un chip de resonancia de plasmón superficial.

Es importante destacar que PspCN:CFH (D1119G) se unió muchas veces más débilmente que PspCN:CFH (tipo salvaje) a C3d y mostró poca mejora, sobre CFH (D1119G) solo, de la aceleración delo deterioro de C3b.Bb. Por lo tanto, los inventores plantearon la hipótesis de que CFH "oculta" los sitios reguladores para evitar la explotación

bacteriana, pero PspC los expone. Los conmutadores conformacionales FH similares pueden operar en autosuperficies.

Existe una necesidad insatisfecha de métodos y composiciones para unir selectivamente componentes del complemento, en particular CFH, a soportes sólidos y para modular la actividad del complemento. La capacidad de modular la actividad del complemento abre oportunidades, entre otras cosas, para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad aberrante del complemento.

Declaraciones de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, como se define en las reivindicaciones 1 a 10 adjuntas, se proporciona una proteína recombinante inmovilizada en una superficie, la proteína recombinante es capaz de unirse al factor H del complemento (CFH), e inducir así una mayor unión de C3d y C3b por CFH unido en comparación con CFH no unido, en el que la proteína recombinante se une a CFH dentro de las proteínas del complemento (CCP) 8-10 de CFH.

De este modo, las proteínas de la presente invención pueden actuar, a través de su interacción con CFH, como inhibidores de la amplificación de C3b en la ruta alternativa del complemento.

Preferiblemente, dicha proteína es capaz de unirse a CFH de tipo salvaje para formar un complejo con una constante de disociación de K_D de 1 x 10^{-10} M o menos, más preferiblemente con una K_D de 1 x 10^{-11} M o menos, aún más preferiblemente con una K_D de 1 x 10^{-12} M o menos, y más preferiblemente con una K_D de 1x 10^{-13} M o menos.

A continuación se exponen ensayos apropiados para evaluar la capacidad de cualquier proteína para lograr este requisito.

De manera adecuada, la proteína se deriva de una proteína bacteriana. Por ejemplo, la proteína puede ser un fragmento de una proteína bacteriana.

Los patógenos que se ha demostrado que reclutan el factor H incluyen: *Aspergillus spp*.; *Borrelia burgdorferi; B. duttonii; B. recurrentis; Candida albicans; Francisella tularensis; Haemophilus influenzae; Neisseria meningitidis; Streptococcus pyogenes;* y *Streptococcus pneumoniae.*

De acuerdo con lo anterior, las proteínas de dichos patógenos se pueden usar para desarrollar proteínas según la presente invención.

En las realizaciones preferidas de la invención, la proteína se deriva de un factor de virulencia bacteriana, por ejemplo, corresponde a un fragmento o variante de un factor de virulencia.

En una realización preferida de la invención, las proteínas de la presente invención se derivan de una proteína de superficie neumocócica, especialmente la proteína de superficie neumocócica C (PspC) de *Streptococcus pneumoniae*.

Se conocen diversas formas de PspC, por ejemplo, variantes derivadas de diferentes cepas de *S. pneumoniae*. Cualquiera de estas variantes se puede usar en la presente invención. Las PspC derivadas de las cepas D39 y TIGR4 son variantes particularmente bien estudiadas, y fueron el foco de la experimentación específica que se describe a continuación.

De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida de la presente invención, las proteínas de la presente invención se pueden derivar de PspC de la cepa D39 (NCTC no 7466) de *S. pneumoniae*. En otra realización preferida de la presente invención, las proteínas de la presente invención se pueden derivar de CbpA de la cepa TIGR4 (NCTC no 7465). Sin embargo, se podría usar una proteína PspC de cualquier otra cepa, siempre que sea capaz de unirse y mejorar la actividad reguladora del complemento de CFH.

Los números de acceso GenBank/EMBL para la secuencia de nucleótidos de PspC de diversas cepas diferentes son los siguientes: D39, AF068646; EF6796, U72655; DBL6A, AF068645; E134, AF068647; BG8090, AF068648; L81905, AF068649; y BG9163, AF068650.

De manera adecuada, la proteína de la presente invención comprende un fragmento de PspC, en el que dicho fragmento comprende una parte de la región N-terminal de PspC.

En una realización de la presente invención, la proteína de la presente invención comprende un fragmento de PspC que comprende una parte de los primeros 250 aminoácidos de PspC, numerados del extremo N, o una variante funcional del mismo. Preferiblemente, la proteína de la presente invención no comprende secuencias adicionales de PspC. Es decir, la proteína comprende una parte de los primeros 250 aminoácidos de PspC, y puede contener otras secuencias además de esto, pero estas secuencias preferiblemente no son secuencias derivadas de PspC.

De manera adecuada, la proteína comprende un fragmento de PspC, o una variante de la misma, que tiene desde 70 a 150 residuos de aminoácidos de longitud, adecuadamente desde 80 a 130 residuos de aminoácidos de longitud, y por lo general desde 90 a 120 aminoácidos de longitud.

De manera adecuada, la proteína completa según la presente invención tiene desde 70 a 150 residuos de aminoácidos de longitud, adecuadamente desde 80 a 130 residuos de aminoácidos, y opcionalmente desde 90 a 120 residuos de aminoácidos, pero en muchos casos, por ejemplo, las proteínas de fusión, pueden ser más grandes.

En algunas realizaciones, la proteína de la presente invención es soluble en el entorno fisiológico, por ejemplo, en suero En otros casos, podría ser insoluble o unida o adsorbida a una superficie.

En una realización preferida, la proteína de la presente invención comprende la secuencia:

ATENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIKT
KYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEK (SEQ ID NO 1),

o una variante funcional o fragmento de la misma.

Esta secuencia específica comprende los residuos de aminoácidos 37-140 de PspC y en adelante se denomina PspCN. La numeración de aminoácidos se basa en la secuencia de PspC de longitud completa como se establece en la entrada de Genbank no AF068646.

La PspCN representa un fragmento de PspC, derivado de la región N-terminal, que tiene la capacidad de unirse extremadamente fuerte y activar CFH. De hecho, se une a CFH con tanta fuerza que parece ser irreversible, a todos los efectos.

En otra realización preferida, la proteína de la presente invención comprende la secuencia:

KQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDA
AFEKFKKDTLKPGEK (SEQ ID NO 2)

o una variante funcional o fragmento de la misma.

Esta secuencia específica representa una forma truncada adicional a partir de PspC, en comparación con PspCN, que comprende los aminoácidos 62-140 de PspC, y se denominará PspCN (62-140). Parece que PspCN (62-140) representa el fragmento mínimo o casi mínimo de PspC que se puede unir a CFH con alta afinidad.

En otra realización preferida, la proteína según la presente invención comprende la secuencia:

ATENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSERDKARKEVEEYVKKIVGESYAKSTKK
RHTITVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQLQILMMESRSKVDEAVSKFEKDSSSSSSSDSS
TKPEASDTAKPNKPTEPGEK (SEQ ID NO 9)

o una variante funcional o fragmento de la misma.

Es posible que fragmentos ligeramente más pequeños de PspC también puedan unir CFH con alta afinidad, pero se ha demostrado que el acortamiento del extremo N o C de PspCN (62-140) en 10 aminoácidos es muy perjudicial para la afinidad de unión de CFH.

De este modo, en las realizaciones preferidas de la presente invención, la proteína comprende al menos los residuos de aminoácidos 68-136, y más preferiblemente 65-138, aún más preferiblemente 62-140 de PspC, de una variante funcional de la misma.

Por supuesto, es posible que las partes dentro de PspCN (62-140) se puedan eliminar o reemplazar sin afectar negativamente la funcionalidad de la proteína, y determinar qué regiones se podrían eliminar o reemplazar está dentro de las habilidades rutinarias del experto en el arte. Las proteínas en las que se han eliminado o reemplazado partes dentro de los aminoácidos 62-140, pero que permanecen funcionales, están dentro del alcance de la presente invención, como se discute con más detalle a continuación.

Una propiedad particularmente interesante de las proteínas de la presente invención es que parecen ser altamente selectivas para CFH. Por ejemplo, parece que las proteínas según la presente invención se pueden unir selectivamente a CFH con preferencia a la proteína relacionada con la proteína 1 similar a CFH u otras proteínas relacionadas con CFH. Esto tiene implicaciones en términos de usos terapéuticos, de diagnóstico y otros usos de las proteínas.

Las proteínas de la presente invención se unen preferiblemente a CFH principalmente en una ubicación dentro de las proteínas de control del complemento (CCP) 8-10 de CFH.

Adicionalmente, los fragmentos descritos anteriormente pueden ser parte de una proteína más grande y retener sus propiedades de unión (por ejemplo, como parte de una proteína de fusión o un fragmento más grande de PspC).

De este modo, será evidente para el experto que la invención no está restringida a la secuencia precisa de SEQ ID NO 1 o 2, y que las variantes o fragmentos de la misma que retienen las actividades biológicas de PspCN, esto es, permanecen funcionales con respecto a la unión y activación de CFH también está dentro del alcance de la presente invención.

En particular, variantes o fragmentos que tienen una K_D cuando se forman complejos con CFH de tipo salvaje de 10 nM o menos, más preferiblemente 1 nM o menos, más preferiblemente 100 pM o menos, más preferiblemente 10 pM o menos y más preferiblemente 1 pM o menos son realizaciones preferidas de la presente invención. Sorprendentemente, se ha medido que proteínas tales como PspCN y PspCN (62-140) tienen una K_D tan baja como 5×10^{-14} M y, de este modo, las proteínas especialmente preferidas de la presente invención tienen una afinidad representada por una K_D de 1×10^{-13} M o menos. No es necesario decir que una mayor afinidad corresponde a una K_D más baja.

Como se usa en este documento, el término "proteína" se puede usar indistintamente con "péptido" o "polipéptido", y significa al menos dos residuos de aminoácidos alfa unidos covalentemente unidos por un enlace peptidilo. El término proteína abarca productos naturales purificados, o productos químicos, que se pueden producirse parcial o totalmente usando técnicas recombinantes o sintéticas. El término proteína se puede referir a un complejo de más de un polipéptido, tal como un dímero u otro multímero, una proteína de fusión, una variante de proteína o un derivado del mismo. El término también incluye proteínas modificadas, por ejemplo, una proteína modificada por glicosilación, acetilación, fosforilación, pegilación, ubiquitinación, etc. Una proteína puede comprender aminoácidos no codificados por un codón de ácido nucleico.

Será obvio que las proteínas que tienen modificaciones menores en la secuencia son igualmente útiles, siempre que sean funcionales, y de este modo la invención también proporciona una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 50% de similitud con la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO 1 o un fragmento funcional del mismo. La invención proporciona preferiblemente una proteína que comprende una secuencia de polipéptidos que tiene al menos 60%, o preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente 80%, más preferiblemente, 90%, más preferiblemente al menos 99%, más preferiblemente 100% de similitud con la secuencia en SEQ ID NO 1, o un fragmento funcional de la misma.

El término "similitud" se refiere a un grado de similitud entre las proteínas en vista de las diferencias en los aminoácidos, pero se tiene en cuenta qué aminoácidos diferentes son funcionalmente similares en vista de un tamaño casi igual, lipofilia, acidez, etc. Se puede calcular un porcentaje de similitud mediante la alineación óptima de las secuencias usando una matriz de puntuación de similitud tal como la matriz Blosum62 descrita en Henikoff S. and Henikoff J.G., P.N.A.S. USA 1992, 89: 10915-10919. El cálculo del porcentaje de similitud y la alineación óptima de dos secuencias usando la matriz de similitud Blosum62 y el algoritmo de Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) se pueden realizar usando el programa GAP del Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, USA) usando los parámetros predeterminados del programa.

Los parámetros ejemplares para las comparaciones de aminoácidos en la presente invención usan la matriz Blosum62 (Henikoff and Henikoff, supra) en asociación con los siguientes ajustes para el programa GAP:

- Penalización de brecha: 8

- Penalización de longitud de brecha: 2

- No hay penalización por brechas finales.

Las formas polimórficas de PspC se incluyen en la presente invención. Las variantes de las proteínas que también forman parte de la presente invención son variantes naturales o sintéticas que pueden contener variaciones en la secuencia de residuos de aminoácidos debido a deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o más residuos de aminoácidos en dicha secuencia o debido a una alteración de una unidad estructural químicamente ligado a una proteína. Por ejemplo, una variante de proteína puede ser un carbohidrato alterado o una estructura de PEG unida a una proteína. Las proteínas de la invención pueden incluir al menos una de tales modificaciones de proteínas.

Las variantes de sustitución de proteínas son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos y se ha insertado un residuo de aminoácido diferente en su lugar. Las proteínas de la presente invención pueden contener sustituciones conservadoras o no conservadoras.

El término "sustitución conservadora" se refiere a la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares. Por lo general, las sustituciones conservadoras tienen

poco o ningún impacto en la actividad de una proteína resultante. Por ejemplo, una sustitución conservadora en una proteína de la presente invención puede ser una sustitución de residuo de aminoácido que no afecta sustancialmente la capacidad de la proteína para unirse y activar CFH. El cribado de variantes de las proteínas de la presente invención se puede usar para identificar qué residuos de aminoácidos pueden tolerar una sustitución de residuos de aminoácidos. En un ejemplo, la actividad biológica relevante de una proteína modificada no disminuye en más del 25%, preferiblemente no más del 20%, especialmente no más del 10%, en comparación con PspCN cuando se efectúan una o más sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos.

Se pueden incluir una o más sustituciones conservadoras en una proteína de la presente invención. En un ejemplo, se incluyen 10 o menos sustituciones conservadoras en la proteína. Por lo tanto, una proteína de la invención puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones conservadoras. Se puede producir un polipéptido que contenga una o más sustituciones conservadoras manipulando la secuencia de nucleótidos que codifica ese polipéptido usando, por ejemplo, procedimientos estándar tales como mutagénesis dirigida al sitio, síntesis génica o PCR. De manera alternativa, se puede producir un polipéptido que contenga una o más sustituciones conservadoras usando métodos de síntesis de péptidos, por ejemplo, como se conoce en la técnica.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos que se pueden sustituir por un residuo de aminoácidos original en una proteína y que se consideran sustituciones conservadoras incluyen: Ser para Ala; Lys para Arg; Gln o His para Asn; Glu para Asp; Asn para Gln; Asp para Glu; Pro para Gly; Asn o Gln para His; Leu o Val para Ile; Ile o Val para Leu; Arg o Gln para Lys; Leu o Ile para Met; Met, Leu o Tyr para Phe; Thr para Ser; Ser para Thr; Tyr para Trp; Trp o Phe para Tyr; e Ile o Leu para Val. En una realización, las sustituciones están entre Ala, Val Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre Lys y Arg; y/o entre Phe y Tyr. Se puede encontrar más información sobre sustituciones conservadoras en, entre otros lugares, Ben-Bassat et al., (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987), O'Regan et al., (Gene 77:237-51, 1989), Sahin-Toth et al., (Protein Sci. 3:240-7, 1994), Hochuli et al., (Bio/Technology 6:1321-5, 1988), WO 00/67796 (Curd et al.) y en los libros de texto estándar de genética y biología molecular.

Otras variantes pueden ser, por ejemplo, variantes funcionales tales como sales, amidas, ésteres, y específicamente ésteres C-terminales, y derivados de N-acilo. También se incluyen péptidos que se modifican *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo por glicosilación, amidación, carboxilación o fosforilación.

Las proteínas según la presente invención se pueden modificar mediante una variedad de técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad que los péptidos no modificados, y opcionalmente que tienen otras propiedades deseables. Por ejemplo, los grupos de ácido carboxílico de la proteína, ya sea de carboxilo terminal o de cadena lateral, se pueden proporcionar en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificado, por ejemplo para formar un éster de alquilo C1-C6, o convertirse en una amida, por ejemplo de fórmula CONR1R2 en la que R1 y R2 son cada uno independientemente H o alquilo C1-C6, o combinados para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea aminoterminal o de cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, tal como el HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o pueden ser modificados a alquilo C1-C6 o dialquil amino o convertidos adicionalmente en una amida. Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales peptídicas se pueden convertir en grupos alcoxi o éster, por ejemplo alcoxi C1-C6 o éster de alquilo C1-C6, usando técnicas bien reconocidas. Los anillos fenilo y fenólico de las cadenas laterales peptídicas pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de tales ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales peptídicas se pueden extender a alquilenos C2-C4 homólogos. Los tioles se pueden proteger con uno cualquiera de un número de grupos protectores bien reconocidos, tales como los grupos acetamida. Los expertos en el arte también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de esta divulgación para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que den como resultado una estabilidad mejorada.

Las proteínas que comprenden solo un fragmento funcional de PspCN o una variante del mismo también forman parte de la presente invención. Un fragmento funcional es un fragmento que al menos representa la parte o partes de la proteína, que son esenciales para que la proteína pueda servir para unirse y activar CFH, y puede cumplir esta función, por ejemplo, cuando se usa solo o en una forma de múltiples subunidades. De este modo, tales fragmentos funcionales pueden ser polipéptidos que son funcionales *per se*, o los fragmentos pueden ser funcionales cuando se unen a otros polipéptidos, por ejemplo, para obtener proteínas quiméricas. Se entiende que tales fragmentos funcionales caen dentro del alcance de la presente invención. Se puede determinar si un fragmento es funcional usando los diversos bioensayos descritos en este documento.

Se pueden producir fragmentos, entre otros, mediante escisión enzimática de moléculas precursoras, usando endonucleasas de restricción para el ADN y proteasas para los polipéptidos. Otros métodos incluyen la síntesis química de los fragmentos o la producción de fragmentos de péptidos codificados por el ADN.

La proteína de la presente invención puede ser una proteína de fusión. El experto en el arte conoce bien numerosos medios para unir dos o más subunidades para formar una proteína de fusión. Tales proteínas de fusión pueden comprender un enlazante o no tener enlazante. Los enlazantes apropiados son bien conocidos en la técnica, y se

puede encontrar información relevante, entre otras cosas, en George RA and Heringa J. “An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding”. Protein Eng, 2002 Nov; 15(11) 871-9.

La bioactividad de las proteínas según la invención se puede medir *in vitro* usando un bioensayo apropiado. Los bioensayos apropiados se describen a continuación en detalle e incluyen el uso de resonancia de plasmón superficial (SPR) para medir la unión de la proteína a CFH y medir la capacidad de CFH unido a proteína para interactuar con otros componentes del complemento relevantes (por ejemplo, unión a C3b o C3d, o induciendo el deterioro de C3b.Bb).

Por lo general, la proteína de la presente invención es una proteína recombinante. Por ejemplo, la proteína se puede fabricar a través de la expresión en una línea celular apropiada, tal como levadura o E. coli.

En una divulgación adicional es un compuesto que comprende la proteína unida a CFH, en la que CFH se mantiene en una conformación, o conformaciones, que es/son más activas que la conformación o conformaciones adoptadas por CFH solo. Dicho compuesto puede ser útil como terapéutico para aumentar los niveles de actividad de CFH en un sujeto.

En una divulgación adicional se proporciona un ácido nucleico que codifica la proteína recombinante.

En otra divulgación, se proporciona un vector recombinante que comprende un polinucleótido descrito anteriormente. Los vectores apropiados incluyen plásmidos bacterianos o de levadura, cósmidos, fagémidos, fosmidos, plásmidos de amplio intervalo de huéspedes y vectores derivados de combinaciones de ADN de plásmidos y fagos o virus. Un origen de replicación y/o un marcador de selección dominante puede estar presente adecuadamente en el vector.

Los vectores son apropiados para transformar una célula huésped. Ejemplos de vectores de clonación apropiados son vectores plasmídicos tales como pBR322, los diversos plásmidos pUC, pEMBL y Bluescript, o vectores virales.

Cuando se usa para la expresión de un gen que codifica las proteínas inmovilizadas en una superficie de la presente invención, un vector por lo general comprende una secuencia de control de expresión operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína para controlar la expresión del polinucleótido relevante. Tales secuencias de control de la expresión generalmente comprenden una secuencia promotora y secuencias adicionales que regulan la transcripción y traducción y/o mejoran los niveles de expresión. Las secuencias de control de expresión apropiadas son bien conocidas en la técnica e incluyen un promotor eucariota, procariota o viral o una señal de poli-A. El control de expresión y otras secuencias variarán, por supuesto, dependiendo de la célula huésped seleccionada y pueden ser constitutivas o se pueden hacer inducibles. Ejemplos de promotores útiles son el promotor SV-40 ((Science 1983, 222: 524-527), el promotor de metalotioneína (Nature 1982, 296: 39-42), el promotor de choque térmico (Voellmy et al., P.N.A.S. USA 1985, 82: 4949-4953), el promotor PRX gX (Mettenleiter and Rauh, J. Virol. Methods 1990, 30: 55-66), el promotor CMV IE humano (US 5,168,062), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al., P.N.A.S. USA 1982, 79: 6777-6781), o promotor alfa o ubiquitina del factor de elongación humana 1. Se conocen muchas otras secuencias de control apropiadas en la técnica, y sería una rutina para el experto seleccionar secuencias apropiadas para el sistema de expresión que se usa.

Después de que el polinucleótido se ha clonado en un vector apropiado, la construcción se puede transferir a una célula (por ejemplo, célula animal, bacteria o levadura) mediante un método apropiado, tal como electroporación, transfección con $CaCl_2$ o lipofectinas. Cuando se usa un sistema de expresión de baculovirus, el vector de transferencia que contiene el polinucleótido se puede transfectar junto con un genoma de baculo completo.

Estas técnicas son bien conocidas en la técnica y los fabricantes de materiales biológicos moleculares (tales como Clontech, Stratagene, Promega, y/o Invitrogen) proporcionan reactivos e instrucciones apropiados sobre cómo usarlos. Adicionalmente, hay una serie de libros de texto de referencia estándar que proporcionan más información al respecto, por ejemplo, Rodriguez, R. L. and D. T. Denhardt, ed., "Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses", Butterworths, 1988; Current protocols in Molecular Biology, eds.: F. M. Ausubel et al., Wiley N. Y., 1995; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, supra; y DNA Cloning, Vol. 1-4, 2nd edition 1995, eds.: Glover and Hames, Oxford University Press).

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una célula capaz de expresar una proteína recombinante, caracterizada porque la célula comprende un polinucleótido como se describe anteriormente que codifica la proteína recombinante que se va a expresar. De manera adecuada, la célula es una célula huésped transformada con un polinucleótido o vector como se describe anteriormente. El polinucleótido o vector según la divulgación se puede integrar de manera estable en el material genómico de la célula o puede ser parte de un vector de replicación autónoma. "Recombinante" en este contexto se refiere a una proteína que no se expresa en la célula en la naturaleza.

De acuerdo con lo anterior, la célula puede ser capaz de producir una proteína recombinante.

Las células huésped se pueden cultivar en medios nutritivos convencionales que se pueden modificar, por ejemplo, para la selección, amplificación o inducción apropiadas de la transcripción y, de este modo, la expresión de la proteína recombinante.

Las células huésped pueden ser procariotas o eucariotas. Las células procariotas apropiadas incluyen, por ejemplo, *E. coli, Corynebacterium* o *Pseudomonas fluorescens*. Las células eucariotas apropiadas incluyen, por ejemplo, células de *Pichia pastoris*, células de insecto, células, HeLa, BHK, HEK-293T, CHO, o COS-7.

Las condiciones de cultivo apropiadas para diversos tipos de células apropiadas son bien conocidas para el experto en el arte.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un cultivo celular que comprende células según la invención.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una proteína según la divulgación para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una proteína según la divulgación para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad (afección) u otra complicación médica asociada con la actividad reguladora del complemento aberrante en un sujeto o donde se reduce la actividad del complemento es beneficioso

Las proteínas de la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades en las que el complemento es inapropiadamente activo, por ejemplo, es hiperactivo.

Las proteínas de la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades en las que la vía alternativa del complemento es inapropiadamente activa.

Las proteínas de la divulgación son particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades en las que el CFH no puede modular adecuadamente la activación del complemento, por ejemplo, debido a niveles reducidos de CFH en plasma o mutación o un SNP dentro del gen (o sus regiones reguladoras) que codifica CFH que reduce la producción de CFH o la actividad reguladora, o debido a cambios en los marcadores de autosuperficie como pueden ocurrir, por ejemplo, con edad o patología, o debido a la competencia con la unión a la superficie por CFH de proteínas relacionadas con CFH. Adicionalmente, las proteínas de la divulgación pueden ser útiles cuando los mecanismos reguladores del complemento se han desbordado por alguna otra razón, por ejemplo, donde otros reguladores del complemento son deficientes en algún aspecto o cuando los desencadenantes de la activación del complemento, que incluyen tanto materia extraña como los productos del daño o la muerte de las células huésped, son abundantes. Tales enfermedades son bien conocidas por aquellos familiarizados con el campo. Como se sabe en la técnica, CFH regula la activación del complemento en la fase fluida, y en las células y autosuperficies, al poseer actividad cofactor para la escisión de C3b mediada por el factor I y actividad de aceleración del deterioro contra la ruta alternativa C3-convertasa. C3b.Bb.

De manera adecuada, la enfermedad es uno o más de:

- Hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH),
- Síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS),
- Enfermedad por depósitos densos (DDD);
- Degeneración macular relacionada con la edad (AMD);
- Lupus eritematoso sistémico (SLE);
- Sepsis; y
- Enfermedad de Alzheimer.

De particular interés de este grupo de enfermedades son PNH, aHUS, DDD y AMD, en las cuales las proteínas de la divulgación se consideran particularmente útiles.

De manera adecuada, la enfermedad mencionada anteriormente está asociada con una mutación o que afecta el CFH. Sin embargo, algunas de las enfermedades mencionadas anteriormente (por ejemplo, PNH) no implican mutaciones o SNP en CFH, y, para aquellas enfermedades que sí implican mutaciones o SNP en CFH, no todas las ocurrencias de las enfermedades mencionadas anteriormente son causadas (total o parcialmente) por tales mutaciones o SNP en CFH. Las proteínas de la divulgación están claramente bien adaptadas para casos en los que CFH está directamente implicado. Sin embargo, incluso en los casos en que no está presente una mutación o SNP en CFH, las proteínas de la divulgación aún pueden ser útiles para tratar la afección.

Las proteínas de la divulgación potencian la actividad de CFH y, como tal, se pueden usar para aumentar la actividad de CFH en condiciones en las que la actividad inadecuada de CFH contribuye a la patología de la afección.

En vista de la llegada de la medicina estratificada/personalizada, en la que las enfermedades se perfilan y las terapias apropiadas se seleccionan en función del perfil, las proteínas de la divulgación se pueden administrar cuando una enfermedad, por ejemplo una de las enfermedades mencionadas anteriormente, implica niveles o actividad aberrantes

de CFH o en los cuales la vía alternativa del complemento es hiperactiva. Esto permite que el tratamiento con las proteínas de la divulgación se centre en condiciones en las que es probable que ocurra un efecto positivo.

Según un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona una preparación farmacéutica que comprende la proteína de la divulgación o un ácido nucleico que codifica una proteína de la divulgación.

La composición farmacéutica puede comprender adecuadamente un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el portador es apropiado para administración parenteral. El portador puede ser apropiado para administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. En otro ejemplo que no es de la invención reivindicada, el portador es apropiado para administración oral. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las proteínas de fusión de la divulgación, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Normalmente, la preparación de tales composiciones farmacéuticas implica combinar el agente activo con soluciones reguladoras, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y/o excipientes. La solución salina regulada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica conespecífica son diluyentes apropiados de ejemplo para la terapéutica de proteínas.

En un ejemplo, la composición se formula como un liofilizado usando soluciones de excipiente apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes.

Las composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Se encuentran disponibles diversas referencias bibliográficas para facilitar la selección de portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984); Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis et al. (Eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (Eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, New York, NY; Lieberman, et al. (Eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner, Wang, E., Int. J. Pharm. 185:129-188 (1999) and Wang W. Int. J. Pharm. 203:1-60 (2000), y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, New York, NY.

Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente divulgación, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad apropiada del portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación se debe adaptar al modo de administración.

En algunos ejemplos que no son de la invención reivindicada, la proteína de la divulgación se proporciona como un complejo con CFH. Dicho complejo es particularmente valioso cuando un sujeto que se va a tratar tiene una capacidad reducida para producir CFH funcional, y de este modo puede haber CFH inadecuado presente en el sujeto para que la proteína se una y se active.

En un ejemplo que no es de la invención reivindicada, la composición se formula, de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en solución reguladora acuosa isotónica estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como la lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones de la divulgación se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., los formados con grupos amina libres, tales como los derivados de isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc., y los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y feme, etc.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar una proteína de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas: uso de células recombinantes capaces de expresar la proteína de la presente divulgación, uso de endocitosis mediada por el receptor (por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro, etc.

En otro ejemplo que no es de la invención reivindicada, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., 1989, In: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds., Liss, New York, pp. 353-365; Lopez- Berestein, ibid., pp. 317-327; véase generalmente ibid.)

En otro ejemplo más que no es de la invención reivindicada, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar a través de un sistema de liberación controlada.

En un ejemplo específico no de la invención reivindicada donde las composiciones farmacéuticas de la divulgación son un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriéndolo con lípidos, receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en unión a un péptido similar a homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864- 868), etc. De manera alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporarse mediante recombinación homóloga dentro del ADN de la célula huésped para la expresión.

La cantidad de composiciones farmacéuticas de la divulgación que serán eficaces en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Se pueden determinar las dosis apropiadas en los ensayos. Según los estándares apropiados de la industria, también se pueden agregar conservantes, tales como el alcohol bencílico. La cantidad y la frecuencia de la administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y la gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, la condición del paciente, etc. Además, los ensayos *in vitro* se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir según el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación apropiados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 1-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

La divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Opcionalmente asociado con dicho (s) recipiente (s) puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la presente divulgación. En particular, la presente divulgación proporciona el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con la actividad aberrante del complemento en un sujeto.

El sujeto es preferiblemente un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

De manera apropiada, la enfermedad es uno o más de:

- Hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH),

- Síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS),

- Enfermedad por depósitos densos (DDD);

- Degeneración macular relacionada con la edad (AMD);

- Lupus eritematoso sistémico (SLE);

- Sepsis; y

- Enfermedad de Alzheimer.

De particular interés de este grupo de enfermedades son PNH, aHUS, DDD y AMD, en las cuales se considera que las proteínas de la presente divulgación son particularmente útiles.

La presente divulgación contempla la administración de las proteínas de la divulgación en forma de una composición farmacéutica que comprende la proteína de la divulgación y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, particularmente un humano) que lo necesite. La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de enfermedades humanas con tales composiciones.

Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión, por inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.), y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos.

La administración puede ser sistémica o local. La administración pulmonar se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

Por lo general, los métodos de la divulgación comprenderán administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de la divulgación o una composición que comprende un ácido nucleico capaz de expresar una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de la presente divulgación *in vivo*. La cantidad farmacéuticamente eficaz empleada puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo.

Una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de la divulgación puede ser desde aproximadamente 1 μg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 10 μg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 100 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 100 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 500 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 100 μg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 1 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 15 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 25 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 100 μg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 1 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 2.5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o desde aproximadamente 7.5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto a aproximadamente 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto.

En algunos ejemplos que no son de la invención reivindicada, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de la invención puede ser 0.5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 1 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 2 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 3 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 4 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 5 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 6 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 7 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 8 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, 9 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto, o 10 mg de proteína/1 kg de peso corporal del sujeto.

Una forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la proteína de la invención calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Una forma de dosificación unitaria de una proteína de la invención puede ser desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 250 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 300 a aproximadamente 500 mg, o desde

aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg. Una dosis unitaria de una proteína de la invención puede ser aproximadamente 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, o 700 mg.

Las composiciones de la divulgación pueden comprender proteínas de la divulgación a un nivel desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 18 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 16 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 14 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 12 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 8 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 6 % en peso desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 2 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.9 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.8 % en peso, desde aproximadamente 0.1, % en peso a aproximadamente 0.7 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.6 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.5 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.4 % en peso, desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.3 % en peso, o desde aproximadamente 0.1 % en peso a aproximadamente 0.2 % en peso del peso total de la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender una o más proteínas de la divulgación a un nivel desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 18 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 16 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 14 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 12 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 9 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 8 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 7 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 6 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 4 % en peso, desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 3 % en peso, o desde aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 2 % en peso del peso total de la composición. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender una o más proteínas de la divulgación a un nivel de aproximadamente 0.1 % en peso, aproximadamente 0.2 % en peso, aproximadamente 0.3 % en peso, aproximadamente 0.4 % en peso, aproximadamente 0.5 % en peso, aproximadamente 0.6 % en peso, aproximadamente 0.7 % en peso, aproximadamente 0.8 % en peso, aproximadamente 0.9 % en peso, aproximadamente 1 % en peso, aproximadamente 2 % en peso, aproximadamente 3 % en peso, aproximadamente 4 aproximadamente 5 % en peso, aproximadamente 6 % en peso, aproximadamente 7 % en peso, aproximadamente 8 % en peso, o aproximadamente 9 % en peso en base al peso total de la composición.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las composiciones de la divulgación se pueden formular y administrar mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, las composiciones de la divulgación se pueden administrar por vía subcutánea o intramuscular.

En algunos ejemplos que no son de la invención reivindicada, un régimen de dosificación puede implicar la administración de dosis repetidas, por ejemplo, la administración de una dosis semanal. Los regímenes de tratamiento pueden implicar una dosis semanal durante un período de tiempo (por ejemplo, durante cuatro semanas) seguido de un régimen de dosificación de "mantenimiento" menos frecuente (por ejemplo, una mensual o una vez cada dos meses). Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para lograr los resultados terapéuticos deseados.

De manera apropiada, el método implica dirigir la proteína de la presente divulgación a un sitio o tejido específico en el sujeto. Los métodos de direccionamiento son bien conocidos en la técnica, y a menudo incluyen proporcionar una proteína de fusión que incluye una unidad estructural de direccionamiento o una unidad estructural de direccionamiento vinculada de otro modo. Las unidades estructurales de direccionamiento típicos son anticuerpos o ligandos para receptores. Por ejemplo, una fusión de PspCN con un fragmento de anticuerpo contra el colágeno IV dirigiría PspCN al glomérulo, lo que sería útil para tratar aHUS.

La superficie a la que se inmoviliza la proteína recombinante según la invención puede ser cualquier superficie apropiada e incluye, por ejemplo, la superficie de una perla, recipiente, dispositivo médico, microcápsula o un tejido biológico.

Al unir la proteína de la divulgación a una superficie, permite que la superficie se una a CFH. Esto puede ser útil en muchas aplicaciones diferentes. Por ejemplo, el CFH unido se puede usar para proteger la superficie de las consecuencias de la amplificación de C3b. De manera alternativa, la superficie se puede usar para unir selectivamente CFH con fines de diagnóstico, para extraer o purificar CFH desde una mezcla, o para unir CFH para identificar moléculas que interactúan y, de este modo, se unen al CFH capturado.

De manera apropiada, la proteína inmovilizada según la presente invención se puede unir covalentemente a la superficie. Hay muchas técnicas apropiadas disponibles para el experto para lograr la unión covalente. Por ejemplo, la adición de un residuo Cys hacia su extremo N o C proporcionaría un método conveniente de unión a superficies que entran en contacto con sangre o suero. A continuación se describen diversas proteínas modificadas con Cys de la presente invención, que retienen las propiedades de unión y activación de CFH.

De manera alternativa, la proteína se puede unir a través de medios no covalentes, por ejemplo, adsorción pasiva, interacciones proteína/proteína, interacciones iónicas, etc. Por ejemplo, una superficie se puede recubrir con biotina/avidina y la proteína de la presente invención puede ser una fusión con la molécula de biotina/avidina correspondiente para permitir que se una a la superficie.

Los métodos conocidos para modificar la superficie de un dispositivo médico para facilitar el recubrimiento de proteínas incluyen modificación física, modificación química, modificación fotoquímica y tratamiento con plasma; véase, por ejemplo, Vasita, Rajesh; Shanmugam i, K; Katt, DS (2008). "Improved biomaterials for tissue engineering applications: surface modification of polymers". Current Topics in Medicinal Chemistry 8 (4): 341-353, and Morra, M.; Cassinelli, C. (2006). "Biomaterials surface characterization and modification". The International Journal of Artificial Organs 29 (9): 824-833.

En un aspecto adicional, se proporciona un dispositivo médico, en el que la superficie del dispositivo médico está recubierta al menos parcialmente con la proteína recombinante inmovilizada según la presente invención.

De manera apropiada, todas las superficies externas del dispositivo (esto es, aquellas que estarán en contacto con los tejidos y/o fluidos corporales) están recubiertas con la proteína.

El dispositivo médico puede ser esencialmente cualquier dispositivo médico que esté expuesto a los tejidos del cuerpo de un sujeto, por ejemplo, microcápsulas para suministro de células madre, stents, injertos de stent, implantes ortopédicos, catéteres, alambres guía, dispositivos de reparación de válvulas cardíacas y dispositivos circulatorios extracorpóreos.

La presente invención es particularmente apropiada para dispositivos médicos implantables, por ejemplo, microcápsulas, stents, injertos vasculares, implantes ortopédicos, marcapasos y similares, así como dispositivos circulatorios extracorpóreos, tales como equipos usados en hemodiálisis, plasmaféresis, oxigenación de membrana extracorpórea y procedimientos relacionados.

La adsorción de proteínas a las superficies de dispositivos médicos implantables expuestos a la sangre y la consiguiente activación del complemento es un problema común, y provoca reacciones inflamatorias. Al recubrir al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo médico con proteínas según la presente divulgación, se esperaría que la actividad/activaciones del complemento asociadas con dicha superficie se redujeran. La proteína inmovilizada según la presente invención reclutaría el factor H de la sangre/suero y disminuiría la activación del complemento en la superficie o asociada a esta.

En otra realización, el dispositivo se puede recubrir con un compuesto de la proteína de la presente invención unida a CFH.

En un aspecto relacionado de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un dispositivo médico, el método comprende:

- proporcionar un dispositivo médico;

- proporcionar una proteína recombinante capaz de unirse al factor H del complemento (CFH), e inducir así una mayor unión de C3d y C3b por el factor H del complemento unido en comparación con el CFH no unido, en el que la proteína recombinante se une a CFH dentro de las proteínas de control del complemento (CCP) 8 -10 de CFH; y

- unir dicha proteína a al menos una parte de la superficie del dispositivo médico.

La unión de la proteína según la presente divulgación al dispositivo médico puede, por supuesto, llevarse a cabo mediante cualquier técnica apropiada, incluidas las discutidas anteriormente.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de detección de la presencia o cantidad de CFH en una muestra, el método comprende:

- proporcionar una muestra;

- proporcionar una proteína según la presente divulgación;

- poner en contacto la muestra con la proteína de la presente divulgación; y

- detectar la unión de la proteína al CFH presente en la muestra.

De manera apropiada, la proteína según la presente divulgación se podría inmovilizar en una superficie y usar para adsorber CFH en un método análogo a un "ELISA" convencional. La alta afinidad y selectividad de PspCN lo convierte en un agente atractivo para su uso en la cuantificación de los niveles de CFH. A continuación se describen ejemplos de una proteína según la presente divulgación que se usa para cuantificar los niveles de CFH en suero humano normal.

Cuando se combina con modificaciones de PspCN, por ejemplo, modificaciones covalentes, para facilitar el etiquetado/detección (posiblemente mediante la unión de etiquetas fluorescentes a través de residuos de cisteína introducidos u otros medios, o mediante fusión con una enzima a nivel de expresión génica y producción de proteínas), esto hace que PspCN etiquetada sea una opción ideal para la cuantificación de niveles de CFH.

El método puede ser adecuadamente un método de diagnóstico, y de este modo puede implicar detectar la presencia de CFH en una muestra biológica de un sujeto, por ejemplo, una muestra de sangre o una fracción de sangre tal como el plasma. Por ejemplo, se podría permitir que CFH y una proteína de fusión de peroxidasa de rábano picante PspCN formen un complejo que luego es capturado por un anticuerpo y se cuantifica. De manera alternativa, se podría usar PspCN etiquetada con fluorescencia en un ensayo en el que la formación de un complejo con CFH se controla por termoforesis u otro medio apropiado.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método de detección de la presencia o cantidad de PspCN en una muestra, el método comprende:

- proporcionar una muestra;

- proporcionar CFH;

- poner en contacto la muestra con el CFH; y

- detectar la unión de PspCN al CFH presente en la muestra.

El método puede ser un método de detección de la presencia de PspCN en una superficie. La superficie puede ser la membrana de una bacteria. Por lo tanto, el método puede ser un método de detección de la presencia de bacterias *Streptococcus pyogenes* o Streptococcus pneumonia, por ejemplo.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de purificación o separación de CFH de una muestra, el método comprende:

- proporcionar una proteína según la presente divulgación inmovilizada en una superficie;

- proporcionar una muestra;

- pasar la muestra sobre la superficie; y

- recuperar CFH unido a la superficie; y/o

- recuperar la muestra que está desprovista o agotada de CFH.

La superficie puede ser, por ejemplo, la superficie de un recipiente, un conducto, una matriz (por ejemplo, una matriz porosa o fibrosa), perlas, geles o cualquier material de relleno usado en la cromatografía.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de purificación o separación de PspC, PspCN o una proteína de fusión que contiene PspCN de una muestra, el método comprende:

- proporcionar CFH, o una construcción truncada de CFH inmovilizada en una superficie;

- proporcionar una muestra;

- pasar la muestra sobre la superficie; y

- recuperar la PspC, PspCN o proteína de fusión que contiene PspCN unida a la superficie; y/o

- recuperar la muestra que está vacía o agotada de PspC.

La superficie puede ser, por ejemplo, la superficie de un recipiente, un conducto, una matriz (por ejemplo, una matriz porosa o fibrosa), perlas, geles o cualquier material de relleno usado en la cromatografía.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método de recubrimiento de microcápsulas implantables con proteínas según la divulgación que comprende las etapas:

- proporcionar una microcápsula apropiada; e

- inmovilizar las proteínas según la presente invención en dicha microcápsula.

De acuerdo con lo anterior, las microcápsulas así recubiertas tienen una probabilidad reducida de activación del complemento y posterior rechazo. Los ejemplos de tales microcápsulas incluyen, pero no se limitan a, diversas microcápsulas de alginato diseñadas para la encapsulación de células tales como las células de los islotes pancreáticos para su posterior implantación en pacientes con diabetes mellitus tipo I.

El método puede comprender además la etapa de proporcionar CFH o una variante funcional del mismo para unirse a la proteína que recubre la microcápsula.

Las siguientes definiciones son útiles para comprender el alcance apropiado de la presente invención:

"Secuencia de aminoácidos", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína, y fragmentos o partes de la misma, y a moléculas de origen natural o sintéticas. "Secuencia de aminoácidos" y términos similares, tales como "polipéptido" o "proteína" tal como se mencionan en este documento no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula de proteína recitada.

"Cultivo celular", como se usa en este documento, se refiere a una masa proliferativa de células que puede estar en un estado ya sea no diferenciado o diferenciado.

La "proteína de fusión", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que contiene secuencias de aminoácidos de cada una de dos proteínas distintas; está formado por la expresión de un gen recombinante en el que dos secuencias de codificación se han unido para que sus marcos de lectura estén en fase. Los genes híbridos de este tipo se pueden construir *in vitro* para marcar el producto de un gen particular con una proteína que se puede analizar más fácilmente (por ejemplo, un gen fusionado con lacZ en *E. coli* para obtener una proteína de fusión con actividad de β-galactosidasa). De manera alternativa, una proteína puede estar unida a un péptido señal para permitir su secreción por la célula. De manera alternativa, una proteína puede estar unida a un péptido para facilitar la purificación (por ejemplo, una etiqueta de polihistidina). De manera alternativa, una proteína puede estar unida a un péptido para mejorar la expresión en una célula huésped (por ejemplo, fusiones con proteínas SUMO).

El término "aislado" significa un componente biológico (tal como una molécula o proteína de ácido nucleico) que ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente ocurre naturalmente, esto es, otro ADN y ARN cromosómico y extra cromosómico, y proteínas. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos, proteínas y péptidos sintetizados químicamente.

"Secuencia de ácido nucleico" o "ácido nucleico", como se usa en este documento, se refiere a un polímero de nucleótidos en el que la posición 3' de un azúcar nucleótido está unida a la posición 5' del siguiente por un puente fosfodiéster. En una cadena lineal de ácido nucleico, un extremo por lo general tiene un grupo 5' fosfato libre, el otro un grupo hidroxilo 3' libre. Las secuencias de ácido nucleico se pueden usar en este documento para referirse a oligonucleótidos o polinucleótidos, y fragmentos o partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y representan la cadena sentido o antisentido.

Se debe entender que las características, números enteros, características, compuestos, unidades estructurales químicos o grupos descritos en conjunción con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en este documento a menos que sea incompatible con ellos. Todas las características descritas en esta especificación (incluidas las reclamaciones, resúmenes y dibujos adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o procedimiento así descrito, se pueden combinar en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de dichas características y/o las etapas son mutuamente excluyentes. La invención no está restringida a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier novela, o cualquier combinación novedosa, de las características descritas en esta especificación (incluidas las reivindicaciones, resumen y dibujos adjuntos), o cualquier novedad, o cualquier combinación novedosa, de las etapas de cualquier método o procedimiento así descrito.

La atención del lector se dirige a todos los papeles y documentos que se mencionan en esta solicitud, y que están abiertos a inspección pública.

Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora, a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve divulgación de las figuras

Figura 1. Proteínas y complejos investigados en este estudio. Arriba: convertasa C3, C3b.Bb (formada por proteólisis catalizada por CFD del complejo de proconvertasa C3b:CFB), escinde C3 a C3b más C3a; C3b se une a las superficies a través de su dominio de tioéster (TED). Se puede degradar a iC3b más C3f por el factor del complemento I (CFI) en una reacción que requiere CFH u otros cofactores (asociados a la membrana), luego a C3c más C3d(g). C3d(g) se degrada a C3d, que corresponde al TED de C3b. Medio: CFH humano (20 CCP mostradas como óvalos) se purificó del plasma mientras que el (r)CFH recombinante (y rCFH (D1119G)) se produjeron a partir de *Pichia pastoris*, al igual

que los diversos fragmentos de rCFH mostrados. Todas las glucoproteínas producidas por *P. pastoris* fueron tratadas con Endo *Hf* antes de la purificación final. Se indican los sitios de unión en CFH para algunos ligandos (la línea de puntos implica que están ocluidos como se discute en el texto). Abajo: sPspCN y sPspCNR1 recombinantes (producidas por *Escherichia coli*) son fusiones SUMO de polipéptidos con etiqueta *hexa*His N-terminalmente correspondientes a los residuos 37-140 y 37-292 de PspC, respectivamente; la versión escindida se designa PspCN (R1 y R2 son repeticiones 1 y 2; CBD es el dominio de unión a colina).

Figura 2. PspCN forma un complejo estable con CFH. (A) CFH purificado en plasma, (B) CFH(D1119G) recombinante y (C), CFH(wt) recombinante a las concentraciones mostradas, todos se unen a sPspCN inmovilizada (144 RU en un sensorchip NTA/Ni^{2+}) para formar complejos estables que no se disocie apreciablemente durante 25 minutos. El sensorchip se despojó y se volvió a cargar entre las mediciones individuales. Los valores calculados de K_D se presentan en la tabla 1.

Figura 3. PspCN se une principalmente a CCP 8 y 9. El sensorchip que porta sPspCN se preparó como en la figura 2. (A) Una comparación de las curvas de unión obtenidas para CFH 50 nM purificado en plasma, CFH 8-9, CFH 8-15, CFH 10-15 (cerca de la línea de base) y CFH 19-20 (cerca de la línea de base). (B) Un segmento expandido del sensorgrama en (A) para revelar las respuestas muy bajas obtenidas para CFH 19-20 y CFH 10-15. (C) Se hizo fluir una serie de concentraciones de CFH 8-9 sobre PspCN inmovilizado para permitir estimaciones (por el método de equilibrio) de un valor de K_D (véase la tabla 1).

Figura 4. Una superficie de contacto grande en el complejo de CFH 8-9 con PspCN se indica mediante la comparación de los espectros ^{1}H, ^{5}N HSQC (RMN). (A) PspCN libre exhibe un espectro indicativo de una proteína desplegada con poca dispersión de desplazamiento químico. (B) La adición de CFH 8-9 a la muestra de PspCN en A causa un cambio dramático en el espectro de PspCN cuando se une a CFH 8-9. Este espectro del complejo muestra picos agudos bien dispersos indicativos de una proteína plegada compacta. Numerosas perturbaciones de desplazamiento químico son evidentes entre los espectros de CFH 8-9 libre (C) y CFH 8-9 unido a PspCN (D). Ambos espectros de CFH 8-9 muestran picos agudos bien dispersos indicativos de una proteína plegada compacta, sin embargo, los grandes cambios entre los espectros indican que muchos residuos de aminoácidos de CFH 8-9 están implicados en la interacción con PspCN.

Figura 5. PspCN estabiliza la nueva conformación de CFH. (A) Resultado de SDS-PAGE realizado en CFH y CFH: PspCN con reticulante, BS3, indicando bandas (s1-s5) sometidas a espectrometría de masas. MWM = marcadores de peso molecular como se indica (kD); los carriles 1 y 2: 0.5:1 BS3:CFH produce dos bandas (s1, s2) correspondientes a CFH monomérico reticulado, así como una escalera de dímeros/oligómeros de CFH reticulados; los carriles 3 y 4: 4:1 BS3: CFH que muestra el agotamiento de CFH monomérico y una mayor representación del presunto dímero de CFH (s3) y oligómeros. Los carriles 5 y 6: proporción 4:1 de BS3: (CFH + PspCN) produce una sola banda (s4) para CFH monomérico en complejo con PspC, y bandas superiores correspondientes al dímero (s5), trímero, etc. de CFH complejado con un número indeterminado de moléculas de PspCN. (B) Mapa de enlaces cruzados agrupados en s1-s5. Los arcos que representan enlaces cruzados dentro de CFH están codificados por colores (según la clave) para indicar (i) enlaces cruzados en CFH que se volvieron más raros o ya no eran detectables tras la unión de PspCN; (ii) enlaces cruzados que se vuelven más comunes o recientemente detectables tras la dimerización y/o la unión de PspCN; (iii) enlaces cruzados que no mostraron cambios en s1-s5; (iv) enlaces cruzados únicos de dímeros; (v) enlaces cruzados únicos del complejo CFH: PspCN.

Figura 6: Comparación de la unión de C3b y C3d por CFH solo y complejo CFH:PspcN. Demostración por SPR de que (A) el CFH purificado en plasma tiene una menor afinidad por el C3b inmovilizado que el complejo CFH:PspCN purificado en plasma. (B) El CFH purificado en plasma tiene una afinidad muy baja por C3d (que es equivalente a la TED de C3b), pero cuando está en complejo con PspCN, se une bien a C3d. Las constantes de afinidad calculadas se resumen en la tabla 2.

Figura 7: PspCN aumenta la actividad de aceleración del deterioro de CFH. CFH: PspCN 2.5 nM es un mejor acelerador de deterioro que CFH 10 nM, de C3b.Bb, formado por el flujo de C3, CFB y CFD sobre un chip CM5 cargado con una pequeña cantidad de C3b (véase texto).

Figura 8: Propiedades de CFH (D1119G). (A) SDS-PAGE que muestra la pureza de PspCN, rCFH (D1119G), junto con CFH purificado en plasma (Complement Technologies) y rCFH) en condiciones reductoras y no reductoras. (B) rCFH (D1119G) es igual de bueno que CFH para acelerar el deterioro de C3b.Bb; PspCN aumenta la actividad aceleradora del deterioro de CFH sustancialmente más que la de rCFH (D1119G). (C) Ni CFH ni rCFH (D1119G) (ni una mezcla de los dos) protegen los eritrocitos de conejo (que no contienen ácido siálico); PspCN induce cierta capacidad protectora para CFH y la mezcla CFH: rCFH 1:1 (D1119G). (D) rCFH (D1119G) es pobre en la protección de los eritrocitos de oveja (que están sialilados y, por lo tanto, sustituyen a los eritrocitos humanos) de la hemólisis (indicada por la lectura de absorbancia proporcional a la hemoglobina liberada en la ordenada y) en plasma humano diluido (ordenada x) en comparación a CFH. La adición de PspCN mejora el poder protector de CFH (D1119G). Una mezcla de 1 μM:1 μM CFH y rCFH (D1119G) no proporciona protección completa a menos que se agregue PspCN.

La figura 9 muestra gráficos que demuestran el rescate paroxístico de la hemoglobinurea nocterna (PNH) usando proteínas de la presente invención. Los eritrocitos fueron tratados con AET para producir células "similares a PNH".

Las células similares a PNH son susceptibles a la lisis sérica acidificada de manera similar a los eritrocitos de PNH. Gráfico A: Agregar concentraciones crecientes del Factor H inhibe la lisis de los eritrocitos similares a PNH. Gráfico B: Agregar concentraciones crecientes de PspCN inhibe la lisis de los eritrocitos similares a PNH con una IC_{50} de 28 nM. PspCN activa el CFH ya presente en el suero y previene de manera eficaz la lisis.

La figura 10 muestra sensorgramas que muestran las afinidades de unión de los fragmentos PspC (52-140) (A), PspC (62-140) (B), PspC (72-140) (C), para PspC (37-130) (D), PspC (37-120) (E) y PspC (37-110) (F).

La figura 11 muestra sensorgramas que indican que, como es el caso de PspCN de tipo salvaje, tanto Cys-PspCN (A) como PspCNCys (B) tienen la capacidad de unirse casi irreversiblemente a CFH, sin mostrar una tasa de apagado detectable.

La figura 12 muestra un gel que indica que la metoxi-PEG-maleimida se acopla de manera eficaz a Cys-PspCN en condiciones leves, como se puede ver por un cambio en la movilidad bajo SDS-PAGE.

La figura 13 muestra el uso de un ELISA sándwich basado en PspCN para cuantificar CFH purificado en PBS como se usa para hacer una curva estándar (A) y cuantificar el CFH presente en diluciones de suero humano normal (B).

La figura 14 muestra un esquema del plásmido pE-SUMO Kan, que se usó para expresar proteínas de fusión SUMO según la presente invención (http://www.lifesensors.com).

La figura 15 muestra que PspCN etiquetada con cisteína retiene su capacidad de unión a CFH cuando se acopla a través de sus tioles.

La figura 16 muestra que PspCN etiquetada con cisteína muestra una actividad de aceleración del deterioro similar de CFH que PspCN sin una etiqueta de cisteína.

La figura 17 muestra que se puede producir CFH altamente purificada usando PspCN etiquetada con cisteína inmovilizada en un método de una sola etapa.

La figura 18 muestra que la PspCN etiquetada con cisteína inmovilizada en poliestireno activado con maleimida protege la superficie del complemento hasta un punto que depende de la densidad de acoplamiento tras la exposición al suero humano normal.

La figura 19 muestra la detección de autoanticuerpos anti-FH usando PspCN para acoplar FH a una placa de poliestireno en un ensayo de tipo ELISA. Se usó IgG purificada de un paciente previamente demostrado ser positivo para autoanticuerpos anti-FH junto con IgG purificada de suero humano normal. El gráfico muestra claramente que se detecta significativamente más señal en la muestra positiva que en el control a un nivel que depende de la concentración de IgG purificada usada en el ensayo.

La figura 20 muestra los sensorgramas SPR que muestran PspCN inmovilizado de la cepa TIGR4 que se une a FH. A: sensorgramas para residuos de TIGR4 inmovilizados 37-179. B: sensorgramas para residuos TIGR4 inmovilizados 68-148. En cada caso, los sensorgramas indican una manera irreversible similar a la de la cepa D39 y se calcularon K_DS de $1x10^{-16}$ M y $8x10^{-16}$ M para los residuos TIGR4 37-179 y 68-148 respectivamente e indica un mecanismo similar de unión.

La figura 21 muestra el aumento en la actividad de aceleración del deterioro de FH en complejo con PspCN de los residuos de TIGR4 37-179 o los residuos 68-148. También está claro que TIGR4, como D39, no contiene actividad intrínseca de aceleración del deterioro.

Figura 22 Sensorgramas que muestran que PspCN (CbpA) de *S. pneumoniae* tiene la capacidad de activar CFH al aumentar la afinidad del complejo FH:PspCN para C3b y C3d.

A: Sensorgramas que muestran unión de FH y FH:TIGR4 (residuos 37-179) a C3b acoplado;

B: Sensorgramas que muestran unión de FH y FH:TIGR4 (residuos 37-179) a C3d acoplado;

C: Sensorgramas que muestran unión de FH y FH:TIGR4 (residuos 68-148) a C3b acoplado y

D: Sensorgramas que muestran unión de FH y FH: TIGR4 (residuos 68-148) a C3d acoplado. Está claro que, como es el caso de PspCN de la cepa D39 de S. pneumonia, la unión de FH no complejado a C3d es insignificante, mientras que FH complejado con PspCN causa un aumento significativo en la afinidad C3b y un gran aumento en la afinidad C3d. Los K_DS para estas interacciones se enumeran en la tabla 3.

Descripción específica de las realizaciones de la invención y otros ejemplos

Los presentes inventores han descubierto que las proteínas de la presente divulgación tienen la capacidad de unirse al regulador clave de la vía alternativa de activación del complemento, el factor H del complemento humano (CFH), de una manera que es de manera eficaz irreversible en la escala de tiempo biológica (horas a días). Adicionalmente, el

CFH unido a PspCN tiene al menos una afinidad tres veces mayor por su ligando natural C3b y tiene una afinidad mucho mayor para C3d (un importante producto de degradación de C3b).

La afinidad entre CFH y PspCN es tan fuerte que de manera eficaz une PspCN permanentemente con el Factor H. Presumiblemente esto explica el empleo de *S. Pneumoniae* de PspC para protegerse contra la destrucción mediada por el complemento (véase más abajo). La capacidad de PspC para activar CFH lo convierte en un medio aún más eficaz de autoprotección.

De este modo, PspCN y otras proteínas según la presente divulgación representan una forma elegante de capturar CFH en una forma altamente bioactiva. Si se inmovilizara PspCN, se podría usar para aislar CFH de mezclas complejas tales como suero.

Esta capacidad de PspCN para unir CFH y también para mejorar su afinidad por sus ligandos, y por consiguiente su actividad reguladora, también sugiere su uso potencial como agente terapéutico para afecciones donde la etiología primaria es la falta de actividad de CFH. Tales afecciones incluyen el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), la enfermedad por depósitos densos (DDD) y la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Se podrían hacer modificaciones a esta secuencia para facilitar la unión de las etiquetas de marcado/detección o para la unión a la superficie covalente.

Ejemplo 1 - Una conformación "activa" del factor H humano se estabiliza tras su captura irreversible por la proteína PspC de *Streptococcus pneumoniae*

Introducción

El sistema del complemento es el nombre dado a un conjunto de 40-50 proteínas sanguíneas en vertebrados que cooperan entre sí, y con otros componentes inmunes, para reconocer, etiquetar y eliminar materiales potencialmente peligrosos tales como las células foráneas y los productos de la apoptosis. y daño oxidativo[(1)]. Las estrategias empleadas por las bacterias para evadir el sistema del complemento son objetivos potenciales para nuevos antibióticos y vacunas, mientras que la modulación terapéutica del sistema del complemento se está explorando activamente en una amplia gama de contextos clínicos[(2)].

El centro de todas las vías que activan el sistema del complemento es un raro ejemplo de un circuito de retroalimentación positiva en el que la molécula de opsonina y proteína proinflamatoria, C3b, se amplifica a través de la formación del complejo C3b.Bb que escinde enzimáticamente las moléculas de C3 para formar la anafilatoxina C3a más C3b adicional (Figura 1)[(3)]. Nascent C3b tiene una capacidad transitoria para unirse covalentemente, a través de un dominio que contiene tioéster (TED), a cualquier superficie local[(4)]. De este modo, tanto las superficies del huésped (o "auto") como las foráneas (o "no auto") están potencialmente en riesgo de quedar recubiertas con moléculas C3b.

El factor del complemento H[(5-8)], que está compuesto por 20 CCP[(9, 10)], es un regulador soluble importante de este evento clave ya que compite con el factor B del complemento (CFB, el precursor de Bb) por la unión a C3b, acelera la disociación irreversible (también conocida como deterioro) del complejo C3b.Bb, y es un cofactor para la división catalizada por factor I (CFI) del complemento de C3b para formar iC3b que no se puede unir a CFB pero (como productos de degradación proteolíticos unidos a la superficie secuencial adicional C3dg y C3d) continúa funcionando como una opsonina. El producto de división final, C3d, que equivale al TED de C3b (figura 1), permanece unido químicamente a la superficie a largo plazo. Mediante la ligadura del receptor del complemento tipo 2 en las células B, la presencia de iC3b o C3d(g) reduce el umbral para la producción de anticuerpos [(11)]. De este modo, el CFH es crítica para la discriminación auto frente no auto por el sistema del complemento, ya que evita la amplificación de C3b tanto en la fase fluida como en las autosuperficies y facilita la producción de iC3b/C3d(g), pero permite la opsonización, liberación de anafilatoxinas y lisis celular para proceder a otra parte.

La importancia de CFH para la modulación de la amplificación de C3b está subrayada por los vínculos entre las variaciones alélicas en el gen CFH y el riesgo de una gama de enfermedades asociadas con un sistema del complemento regulado incorrectamente [(12)]. El "haplotipo 2" común (uno de cada tres alelos) de CFH es responsable de aproximadamente el 50% del riesgo de degeneración macular relacionada con la edad [(13)]; incluye la sustitución de histidina por tirosina en la posición 402 en CCP 7 que contribuye al reconocimiento por CFH de marcadores moleculares específicos de autosuperficie (tales como cadenas GAG y grupos de ácido siálico) [(14-17)]. Las mutaciones vinculadas a la enfermedad renal potencialmente mortal, el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) se producen en todo el CFH, pero se agrupan en las CCP 19 y 20 [(18)] que también contribuyen al reconocimiento de la superficie pero también contienen un sitio de unión para C3b y sus productos de degradación [(15)]. Las cuatro CCP N-terminales de CFH se unen a C3b (pero no iC3b o C3d), son necesarios tanto para el cofactor como para la actividad de aceleración del deterioro [(19)], y albergan mutaciones y SNP vinculados a la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), aHUS y glomulonefritis membranoproliferativa tipo II[(20)]. Las proteínas potencialmente terapéuticas diseñadas para incorporar CCP 1-4[(21)], o ambas CCP 1-4 y CCP 19-20[(22, 23)], se encuentran en diversas etapas de desarrollo.

Como el principal regulador soluble del sistema del complemento, el CFH es inevitablemente susceptible al secuestro microbiano. No es sorprendente que muchas proteínas de la superficie bacteriana se unan al CFH en plasma[24, 25]. Por ejemplo, la proteína subcapsular PspC de la bacteria comensal nasofaríngea *Streptococcus pneumoniae* (también llamada SpsA, CbpA e Hic) captura CFH derivado del huésped en la superficie de la cápside [26-28]. La invasión del tracto respiratorio inferior o de sangre por *S. pneumoniae* puede causar neumonía, meningitis y septicemia. Existe un creciente y preocupante reconocimiento de que las cepas resistentes a la vacuna pueden colonizar el tracto nasofaríngeo, reemplazando a las cepas cuyos serotipos capsulares están presentes en las vacunas [Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. Lancet. 2011 Dec 3;378(9807):1962-73. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62225-8]. De este modo, es de gran interés que la invasividad del serotipo parece estar determinada principalmente por la capacidad de unirse a CFH. Las diferencias en los niveles de producción, o variación alélica, de la PspC son probablemente responsables de estas variaciones en la captura de CFH[29].

Un aspecto intrigante de CFH es que sus propiedades reguladoras están moduladas según el contexto C3b. En la fase fluida, el CFH restringe la producción de C3b a un nivel requerido para la vigilancia inmune (a través de la capacidad transitoria del C3b naciente para unirse covalentemente a cualquier superficie local) pero, lo que es más importante, evita la activación descontrolada que agotaría el C3 y el factor B en plasma[3, 30]. En las superficies del tejido sano del huésped, CFH colabora con los reguladores unidos a la membrana[31] para cerrar la amplificación de C3b casi por completo. Por otro lado, CFH facilita niveles moderados de deposición de C3b y formación de iC3b en el caso de células senescentes o dañadas y restos celulares, lo que conduce a un aclaramiento no inflamatorio[32-34]. Finalmente, CFH no suprime la amplificación de C3b en las células bacterianas (que carecen de proteínas de unión a CFH u otras medidas de contracomplemento) permitiendo así una embestida total del sistema del complemento en un invasor microbiano que implica una opsonización muy rápida, la liberación de C3a proinflamatorio y C5a y citólisis.

¿Por qué la actividad de CFH varía según el contexto de C3b (y C3b.Bb)? Parece poco probable que esto sea simplemente una cuestión de enriquecimiento selectivo de las concentraciones de CFH en aquellas superficies que requieren protección, ya que dicho mecanismo dejaría al CFH altamente vulnerable a ser explotado por microbios. Los inventores se propusieron probar si una carrera armamentista evolutiva entre el huésped y los patógenos podría arrojar luz sobre la relación poco entendida entre la estructura de CFH y su función como un regulador específico de la autosuperficie de la amplificación de C3b. Según una hipótesis, el hecho de que solo seis o siete de un total de 20 CCP en la molécula de CFH, ubicada hacia sus extremos N y C, se relacionan directamente con los ligandos[15] se explica fácilmente si la mayoría o la totalidad de los restantes 13 o 14 CCP actúan para hacer que el CFH sea menos susceptible al secuestro exitoso de proteínas bacterianas. De este modo, según esta idea, el mero enriquecimiento en la superficie bacteriana (o la superficie del huésped) sería insuficiente para una protección bacteriana eficaz (o célula huésped). En cambio, el potencial regulador completo de CFH solo podría revelarse después de un reordenamiento conformacional provocado a través de la interacción con firmas moleculares específicas de autosuperficie, o sus imitaciones en superficies bacterianas. Para probar esta hipótesis, los inventores exploraron la interacción entre CFH y PspC. Esto reveló que PspC se une extremadamente fuertemente a CFH y estabiliza una reorganización de CCP que revela el sitio de unión C3b/C3d previamente ocluido ubicado cerca de su extremo C. Los inventores sugieren que otras proteínas bacterianas, y de hecho marcadores moleculares de la superficie del huésped, también pueden actuar para estabilizar esta forma "activada" de CFH.

Materiales y métodos

Preparación de proteínas.

Las proteínas del complemento humano, purificadas a partir de plasma agrupado, se obtuvieron de Complement Technologies Inc. (Tyler, Texas), se almacenaron según las instrucciones del proveedor y se descongelaron recientemente antes de diluirse y usarse sin purificación adicional. Se preparó una biblioteca de mutantes de truncamiento del módulo CFH recombinante ("fragmentos", véase la figura 1) a partir de *Pichia pastoris* y se caracterizó como se describió previamente [35] y se almacenó a -80 ºC.

Se produjo CFH humano recombinante de longitud completa, con una secuencia de tipo salvaje (CFH (wt)), en *P. pastoris* recombinante cultivado en un fermentador y purificado en una forma desglicosilada enzimáticamente como se describió previamente[35]. El ADN optimizado para la expresión que codifica el mutante D1119G de CFH (CFH (D1119G)) fue sintetizado por Geneart-LifeTech y subclonado en el vector de expresión de *P. pastoris* pPICZαB. La producción y purificación de CFH(D1119G) se realizó posteriormente como se describió previamente para CFH (wt).

Un gen que representa los residuos 37-140 de PspC (D39) se optimizó para la expresión en *Escherichia coli* (véase la SEQ ID NO 4 a continuación) y se compró a GeneArt-LifeTech. La construcción resultante se clonó luego en el vector de expresión de *E. coli* pE-SumoProKan (LifeSensors, Malvern, PA, véase la figura 14) y se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) en caldo de lisogenia (LB). La producción de proteínas se indujo durante la noche a 25 ºC mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.25 mM. La proteína etiquetada con *hexa*His-SUMO resultante se denominó "sPspCN" y se capturó en una columna de afinidad Ni^{2+} inmovilizada HisTrap (GE Healthcare) y se eluyó con un gradiente lineal de imidazol 0-0.5 M. Las muestras de sPspCN se purificaron adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna HiPrep Superdex 75 (GE Healthcare) equilibrada con solución salina

regulada con fosfato (PBS). Se usó una estrategia similar para preparar una construcción más larga, que abarca el dominio R1 adyacente (véase la figura 1), (residuos 37-292) llamada sPspCNR1.

Para la mayoría de los experimentos, el dominio catalítico de la proteasa específica de SUMO, ULP1, se usó para eliminar las etiquetas *hexa*His-SUMO de sPspCN (o sPspCNR1) (sin residuos derivados del vector), después de lo cual la etiqueta fue eliminada por una segunda etapa cromatográfica de afinidad de Ni^{2+}. El material escindido - PspCN (o PspCNR1) - se purificó luego en una columna HiPrep Superdex 75 en PBS como anteriormente. Las proteínas se consideraron homogéneas por SDS-PAGE y la integridad e identidad de las proteínas se confirmó por espectrometría de masas (no mostrada).

Medición derivada de SPR de la unión de CFH a sPspCN

Todos los experimentos de resonancia de plasmón superficial se realizaron a 25 ºC en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) usando HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, surfactante P20 al 0.05% v/v, pH 7.4 (HBS-P^+) suplementado con ácido etilendiaminotetraacético 50 μM (EDTA). Ni^{2+} (51 RU) y posteriormente sPspCN (144) (a través de su etiqueta *hexa*His-SUMO N-terminal) se inmovilizaron en un sensorchip Biacore NTA. Alícuotas de una solución de CFH de longitud completa (de plasma o de *P. pastoris* recombinante), o fragmentos de CFH, fluyeron sobre el chip a las concentraciones mostradas durante 180 s a 100 μl/min, seguido de una fase de disociación de 1500 s. Debido a la unión irreversible por CFH, el sensorchip se regeneró entre mediciones mediante dos inyecciones de 30 s de EDTA 350 mM en NaCl 1 M, seguido de inyecciones de 30 s de NaOH 50 mM, luego 0.5 (p/v)% de dodecilsulfato de sodio (SDS). Los datos se analizaron usando el software de evaluación Biacore, se ajustaron las curvas y se estimaron los parámetros cinéticos sobre la base de un modelo de unión 1:1.

El uso de un sensorchip NTA para medir la afinidad de CFH por sPspCN evitó la necesidad de acoplamiento de amina con su potencial asociado para deposición heteróloga de la proteína y el peligro de enmascarar sitios de reconocimiento de ligandos. Además, permitió una regeneración relativamente sencilla de la superficie del sensorchip SPR entre mediciones. Las desventajas de este método fueron la lixiviación gradual del analito marcado con *hexa*His desde la superficie del chip, y el potencial para que CFH y sus fragmentos se unan directamente a Ni^{2+} (Nan R, Gor J, Lengyel I, Perkins SJ. Uncontrolled zinc- and copper-induced oligomerisation of the human complement regulator factor H and its possible implications for function and disease. J Mol Biol. 2008 Dec 31;384(5):1341-52.). De hecho, se observa (datos no mostrados) una unión débil de CFH a la superficie del sensorchip NTA cargado con Ni^{2+} (sin presencia de PspCN) y una unión fuerte de CFH 6-8 a esta superficie. Estas dificultades fueron evitadas en gran medida por la sustracción de fondo.

Medición SPR de las afinidades de unión de C3b, C3c y C3d

Los experimentos se realizaron como anteriormente excepto C3b (272 RU); C3c (166 RU); y C3d (69 RU) se inmovilizaron, usando acoplamiento de amina estándar, en tres celdas de flujo diferentes de un sensorchip C1 Biacore (la cuarta celda de flujo se usó para la sustracción de fondo). Se inyectó el factor H (preincubado con o sin un exceso molar doble de PspCN) sobre el chip a las concentraciones mostradas (90 s, 30 μl/min), seguido de una fase de disociación de 400 s. El sensorchip se regeneró mediante inyecciones de 2 x 30 s de NaCl 1 M. Los datos se analizaron usando el software de evaluación Biacore y los parámetros de afinidad de equilibrio se calcularon usando un modelo de afinidad de unión 1:1.

Ensayo de aceleración del deterioro

La actividad de aceleración del deterioro de CFH o CFH: PspCN se midió en un ensayo basado en SPR como se describió anteriormente (REF). En resumen, 535 RU de C3b se inmovilizaron en un sensorchip Biacore CM5 mediante acoplamiento de amina estándar. Posteriormente, la convertasa C3 (C3b.Bb) se ensambló en el chip mediante una inyección de 120 s a 10 μl/min de CFB más CFD (500 nM + 50 nM respectivamente). Se observó la formación de C3b.Bb (hasta 145 RU) (por SPR), seguido de una fase de disociación inicial (200 s) para permitir el control de la tasa de deterioro intrínseco de convertasa C3 (salida de Bb). Después de esto, se inyectaron CFH o complejo CFH: PspCN (120 s a 10 μl/min) a las concentraciones mostradas, seguido de una fase de disociación adicional. El chip se regeneró entre ciclos mediante una inyección de 30 s de CFH 0.2 μM, seguido de dos inyecciones de 30 s de NaCl 1 M.

Ensayo hemolítico

Se compró sangre entera de oveja y conejo de TCS Biosciences (Buckingham, Reino Unido) y se adquirió suero agotado con CFH de Complement Technology. El ensayo de hemólisis se realizó en placas de 96 pocillos, en base a un método descrito por Pangburn[36], excepto que se usó HEPES en lugar del solución reguladora veronal más tradicional[37]. Los eritrocitos de 5 ml de sangre completa se lavaron tres veces con HEPES 20 mM; NaCl 145 mM; EDTA 10 mM; 0.1% (p/v) de gelatina (piel porcina, Fluka), pH 7.3 (Solución reguladora H1) y otras tres veces con HEPES 20 mM; NaCl 145 mM; EDTA 100 μM; 0.1% (p/v) de gelatina, pH 7.3 (Solución reguladora H2). El suero agotado con CFH se reconstituyó con la construcción de CFH a 2 μM y se usó a las concentraciones finales indicadas. Los eritrocitos se usaron a una concentración que dio un A_{412} final de 1 (conejo) o 1.2 (oveja) cuando se lisó completamente con agua. El suero reconstituido con CFH se combinó luego en hielo, hasta las concentraciones finales indicadas, con eritrocitos y solución reguladora H2 para producir un volumen final de 45 μl. La lisis se inició mediante

la adición de 5 μl de una solución de Mg^{2+} 50 mM, ácido etilenglicol tetraacético 50 mM, pH 7.3. La reacción se incubó a 37 ºC, durante 30 minutos, después de lo cual se inactivó mediante la adición de 200 μl de solución reguladora H1. Posteriormente, las células no lisadas se sedimentaron por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a 4 ºC, luego se retiraron 100 μl de sobrenadante y se registró el A_{412}.

Cromatografía de afinidad por heparina

Se aplicaron muestras de proteínas (< 0.5 μM) a una columna de cromatografía de heparina HiTrap de 1 ml (GE Healthcare) en fosfato de potasio 20 mM, pH 7.5, y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 1 M sobre 20 volúmenes de columna.

Resonancia magnética nuclear espectroscópica

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Avance II de 800 MHz (Bruker) equipado con una CrioProbe TCI de 5 mm (Bruker). Los datos de RMN se procesaron con TopSpin 3.1 (Bruker) y se analizaron con el paquete de software de análisis CCPNMR [Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. El modelo de datos CCPN para espectroscopía de RMN: desarrollo de una tubería de software. Proteinas 1 de junio de 2005; 59 (4): 687-96.]. Se usaron muestras de FH 8-9 marcado con ^{15}N y PspCN etiquetada con ^{15}N para optimizar las condiciones variando las concentraciones de NaCl desde 0 a 150 mM, pH de 4 - 6.5 y temperatura desde 15 ºC - 70 ºC. Posteriormente, se usó una muestra de FH 8-9 marcado con ^{15}N 40 μM en fosfato de potasio 20 mM, pH 6.2, para registrar un espectro ^{1}H, ^{15}N HSQC a 310 K y luego se agregó PspCN a una concentración final de 100 μM y el espectro fue regrabado. En un experimento separado, se usó una muestra de PspCN etiquetada con ^{15}N 30 μM en fosfato de potasio 20 mM, pH 6.0, para registrar un espectro ^{1}H, ^{15}N HSQC a 298 K y luego se agregó FH 8-9 a una concentración final de 40 μM y el espectro regrabado.

Reticulación y espectrometría de masas (MS)

Las muestras recién descongeladas de CFH purificado en plasma (20 μg) o CFH más PspCN purificado en plasma (20 CFH μg, una relación molar 1:1.15 a PspCN) se reticularon con suberato de bis [sulfosuccinimidil] (BS3) usando una relación de masa 1:4 de proteína a BS3, y una [CFH] final = 0.56 μg/ml en las mezclas de reacción. Los productos de reticulación se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) [(NuPAGE 4-12%, gel Bis-Tris con solución reguladora de análisis MOPS (Invitrogen)]. Las bandas de gel se tiñeron con Instantblue (Expedeon), y las bandas correspondientes a cinco productos de reticulación diferentes (véase la figura 5A) se seleccionaron y cortaron del gel de poliacrilamida. Se sometieron a digestión tríptica en gel como se describe [Chen ZA, Jawhari A, Fischer L, Buchen C, Tahir S, Kamenski T, Rasmussen M, Lariviere L, Bukowski-Wills JC, Nilges M, Cramer P, Rappsilber J. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. EMBO J. 2010 Feb 17;29(4):717-26.]. Para cada muestra, los péptidos reticulados se fraccionaron usando un SCX-StageTip [Ishihama Y, Rappsilber J, Mann M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. J Proteome Res. 2006 Apr;5(4):988-94.]; los péptidos no reticulados deberían eluirse principalmente con bajo de contenido de sal (acetato de amonio 60 mM), mientras que los péptidos reticulados se deberían enriquecer en la fracción con alto contenido de sal (acetato de amonio 500 mM). Las fracciones con alto contenido de sal se analizaron por cromatografía líquida-MS/MS usando un instrumento Q Exactive (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se separaron en una columna analítica empaquetada con material C18 (ReproSil-Pur C18-AQ 3 μm; Dr Maisch GmbH, Alemania) en un emisor PicoTip (New Objective, Woburn, MA). Se aplicó un gradiente lineal que pasó de acetonitrilo acuoso al 1.6% (v/v) a acetonitrilo al 32% (v/v) en agua durante 109 minutos, seguido de un rápido aumento al acetonitrilo al 76% (v/v). Las adquisiciones de espectrometría de masas se llevaron a cabo en una configuración dependiente de los datos: después de cada escaneo MS1, los diez iones más intensos se aislaron y fragmentaron por disociación de trampa C de mayor energía. Los espectros MS1 y MS2 se registraron en el analizador Orbi-trap con una resolución de 70000 para escaneos MS1 y 35000 para escaneos MS2. La "exclusión dinámica" se estableció en 60 s y el "recuento repetido" fue 1.

Los péptidos reticulados se identificaron usando un software escrito interno. En total se identificaron 50 enlaces de estas cinco muestras. La cuantificación sin etiqueta se realizó a nivel de enlace como sigue. Para cada enlace único, se recuperaron las intensidades de señal cromatográfica espectrométrica de masas de todos los péptidos reticulados correspondientes usando el software Pinpoint (Thermo Fisher Scientific) y se sumaron. Para garantizar que se lograra una comparación equitativa entre las muestras, la intensidad de la señal de los pares de enlace individuales se normalizó usando la intensidad de la señal sumada de 23 reticulaciones y 29 péptidos CFH no reticulados que se observaron en las cinco muestras. La variación de la intensidad de reticulación entre las cinco muestras se reflejó en su intensidad relativa dentro de cada muestra, que se calculó como el logaritmo a la base 5 del cociente de la intensidad observada y la intensidad promedio de esta reticulación en cinco muestras. Adicionalmente, usando Cluster 3.0 [de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1453-4.], las 50 reticulaciones observadas se agruparon, en función de sus intensidades relativas en las cinco muestras, para dilucidar la correlación entre su variación de intensidad y las ubicaciones. Estas reticulaciones no se distribuyeron uniformemente a lo largo de la secuencia de CFH y el sesgo en sus ubicaciones proporcionó información valiosa sobre la conformación de CFH de longitud completa y sus cambios conformacionales tras la interacción con PspCN.

Resultados

La región N-terminal de PspCN se une irreversiblemente a CFH

La región N-terminal de PspC de *S. pneumoniae* (cepa D39) (Figura 1) se había mostrado previamente (Dave S, et al. Indian J Med Res. 2004 May;119 Suppl:66-73, and Hammerschmidt S, et al. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. J Immunol. 2007 May 1;178(9):5848-58) para contener el sitio de unión a CFH pero sus límites precisos permanecieron mal definidos. Se produjeron en *E. coli* dos proteínas etiquetadas con *hexa*His-SUMO en el extremo N que corresponden a los residuos de PspC 37-140 (sPspCN) y 37-292 (sPspCNR1) (esto es, incluido el dominio R1, figura 1). Usando SPR se encontró que ni el socio de fusión SUMO (datos no mostrados) ni la presencia del dominio R1 (datos no mostrados) influyeron significativamente en la unión a CFH o los fragmentos CFH. SUMO en sí no se une a CFH (datos no mostrados). Se prepararon series de concentración y se usó SPR para medir las afinidades de CFH purificado en plasma y CFH recombinante (de *P. pastoris*) [(35)] para sPspCN inmovilizada en un chip recubierto con dextrano carboximetilado preinmovilizado con ácido nitrilotriacético (NTA) y cargado con Ni^{2+} (figura 2, tabla 1). En ambos casos, la unión fue de manera eficaz irreversible con tasas de desaceleración demasiado lentas para medir y K_Ds sub-pM. El CFH unido no podía eliminarse mediante lavados con alto contenido de sal; solo quitando el chip NTA con tratamientos secuenciales de soluciones EDTA, NaOH y SDS podría regenerarse la superficie recubierta con sPspCN entre mediciones. No obstante, las superficies recubiertas con sPspCN regeneradas fueron reproducibles dentro de dos unidades de respuesta.

Tabla 1

Construcción	PspCN (D39 37-140)			PspCN (TIGR4 37-179)			PspCN (TIGR4 68-148)		
	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
CFH en plasma	9.7e+6	4.4e- 7	4.5e- 14	1.0e+6	1.3e- 10	1.4e- 16	5.5e+5	4.3e- 10	7.8e- 16
rCFH	1.7e+ll	8.8e- 3	5.3e- 14						
rCFH-D1119G	4.1eE+6	4.7e- 5	1.2e- 11						
CFH 8-15	1.2e+5	1.5e- 4	1.3e-9						
CFH 8-9	-	-	2.6e-8						

Tabla 2

Construcción	*C3b*			*C3d*		
	K_D/M	SE(K_D)	Chi^2/RU^2	K_D/M	SE(K_D)	Chi^2/RU^2
CFH en plasma	4.9e-7	6.0e-8	9.1	N/A	N/A	N/A
CFH:PspCN en plasma	1.6e-7	1.8e-8	40.3	2.3e-6	1.6e-7	0.4
rCFH	5.8e-7	9.3e-8	29.8	N/A	N/A	N/A
rCFH:PspCN	1.6e-7	2.2e-8	81.4	2.1e-6	2.0e-7	4.2
rCFH-D1119G	5.4e-7	9.3e-8	9.4	N/A	N/A	N/A
rCFH-D1119G:PspCN	3.2e-7	4.2e-8	12.6	N/A	N/A	N/A

PspCN se une a un sitio central en CFH

Se informó anteriormente que PspC se unía a diversos sitios de CFH, incluyendo las CCP 8-11, 13-15 y 19-20 (Dave S, *et al.* 2004 Mayand Hammerschmidt S, *et al.* 2007); Duthy TG, et al. Infect Immun. 2002 Oct;70(10):5604-11). Revisamos este problema usando sPspCN con fragmentos de CFH recombinantes relevantes de nuestra biblioteca [(15)] (Figura 1). Se supo (no se muestra) que CFH 6-8 (esto es, la construcción recombinante correspondiente a CFH CCP 6-8) se unía más fuertemente al Ni^{2+} en el chip NTA que CFH de longitud completa o cualquier otro fragmento probado, pero esto no se investigó más a fondo.

Se encuentra (Figura 3, Tabla 1) que CFH 8-15 se une muy fuertemente a sPspCN (K_D = 1-2 nM) y que el complejo sPspCN:CFH 8-15 se disocia muy lentamente aunque no es tan estable como el complejo sPspCN:CFH. Por otro lado, tanto CFH 10-11 (datos no mostrados) como CFH 10-15 tenían una afinidad insignificante por sPspCN, lo que implica que las CCP 8 y 9 son cruciales para la unión. De hecho, el módulo doble CFH 8-9 también se unió fuertemente (K_D = ~26 nM) con una tasa de desaceleración relativamente lenta. No hubo evidencia de unión de sPspCN por CFH 6-8 (después de permitir su afinidad por la superficie del sensorchip NTA cargado con Ni^{2+}, datos no mostrados), mientras que CFH 19-20 se unió transitoriamente y mucho más débilmente que CFH 8-9 o CFH 8-15 (Figura 3).

Que PspCN interactúa estrechamente con CCP 8-9 sugirió el entierro de una superficie interfacial intermolecular sustancial en la formación de complejos. Para investigar más a fondo, se registra un espectro ^{1}H, ^{15}N HSQC RMN de ^{15}N CFH 8-9 con y sin PspCN no etiquetada. Esto reveló el gran número esperado de perturbaciones de desplazamiento químico ^{1}H y ^{15}N (Figura 4A). Curiosamente, el espectro ^{1}H, ^{15}N HSQC de PspCN etiquetada isotópicamente no era consistente con la proteína plegada antes de la adición de CFH 8-9. Las características similares a los glóbulos fundidos de PspCN se confirmaron por su propensión a la unión del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (datos no mostrados). Tras la formación compleja con FH 8-9, el PspCN unido produjo un espectro ^{1}H, ^{15}N HSQC caracterizado por picos cruzados relativamente bien dispersos y resueltos, relativamente agudos. Parece que PspCN existe como una proteína plegada cuando está en complejo con CFH 8-9 (Figura 4B).

Para interrogar la estructura del complejo formado por PspCN y CFH de longitud completa, se usaron una combinación de reticulación química y espectrometría de masas (MS). A las muestras de CFH purificado en plasma mezclada con PspCN agregamos BS3, que es homobifuncional y forma reticulaciones entre aminas primarias que están separadas por hasta 11.4 Å. Luego se resolvieron los productos reticulados por SDS-PAGE, escindimos las bandas y las sometimos a digestión tríptica. Luego se aplicó MS/MS para identificar pares de péptidos reticulados. Dentro del producto reticulado que migró en SDS-PAGE como si tuviera un peso molecular (MW) correspondiente a un complejo PspCN:CFH 1:1 (Banda s4, Figura 5A), se identificaron cinco reticulaciones intermoleculares entre péptidos en PspCN y péptidos en CFH; todos estaban ubicados en las CCP 9 o 10 (figura 5B). Este resultado es completamente consistente con nuestros estudios (arriba) que usan fragmentos de CFH.

Si bien estos experimentos no excluyen la participación directa de otros CCP, en conjunto implican que las CCP 8, 9 y 10 son los principales responsables de las interacciones entre CFH y PspCN. Aunque PspCN, proporcional a su pequeño tamaño (12 kDa), se puede unir directamente a unas pocas CCP centrales (de ~7 kDa cada una), su complejo notablemente estrecho con CFH se puede ver favorecido por un reordenamiento espacial cooperativo de otros CCP, estabilizado por nuevas interacciones intermodulares intramoleculares. Para probar esta hipótesis, comparamos los datos de reticulación química dentro de CFH antes y después de la adición de PspCN.

Análisis de la arquitectura CFH por reticulación y espectrometría de masas

En ausencia de reticulante, se detectó una banda solitaria después de SDS-PAGE de una muestra de CFH purificado en plasma, como se esperaba. Después de una incubación de 60 minutos de la misma muestra de CFH (0.56 μg/μL) con BS3 3.9 mM, aparecieron dos bandas de SDSPAGE que eran candidatas para CFH monomérico (Figura 5A). La banda que migraba más lentamente contenía más reticulaciones de cabeza a cola (por ejemplo, CCP 20 a CCP 4 y CCP 19 a CCP 5) (Figura 5B), lo que refleja la captura de una conformación doblada de nuevo de CFH. La abundancia relativa de dicha conformación en la muestra original es desconocida ya que se acumularía con el tiempo incluso si fuera relativamente rara.

Tras la adición de PspCN a una relación molar de 1.15: 1 a 0.56 μg/μL de CFH, seguido de incubación con BS3 3.9 mM, estas dos bandas colapsaron en una (Figura 5B). Esta banda contenía tanto PspCN como CFH, como se discutió anteriormente. El análisis reveló que la reticulación capturó una conformación compacta diferente de CFH en comparación con la capturada en ausencia de PspCN. Es importante destacar que después de la adición de PspCN, se obtuvieron reticulaciones CCP 20 a CCP 7 y CCP 18 a CCP 5, mientras que las reticulaciones CCP 20 a CCP 4 y CCP 19 a CCP 5 ya no se detectaron (Figura 5B). Además, apareció una nueva banda prominente después de la incubación de CFH con PspCN y el reticulante, que migró consistentemente con el MW de CFH dimérico. Las reticulaciones exclusivas de este supuesto dímero de CFH inducido por PspCN incluyeron CCP 5 a CCP 7 y CCP 18 a CCP 20.

Se supone de estos estudios que la unión de PspCN a CFH central facilita la adopción de una nueva conformación estable de CFH, ayudando a explicar la tasa de disociación insignificante del complejo bimolecular. La conformación de CFH estabilizada con PspCN puede tener sitios de autoasociación expuestos nacientes que explicarían una mayor captura de dímeros por reticulante. Pero el análisis (en ausencia de reticulante) por cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz de ángulo múltiple (SEC-MALS) mostró un complejo predominantemente 1:1 de CFH:PspCN purificado en plasma y no detectó ningún dímero de CFH antes (cargado a 710 ug/ml) o después (cargado a 520 ug/ml) de adición de PspCN. Inesperadamente, se había formado una pequeña cantidad de PspCN dimérico en la muestra enviada para SEC-MALS antes de mezclar con CFH, y había una apariencia correspondiente del complejo FH: $PspCN_2$. Pero estas especies estaban presentes en pequeñas cantidades y casi con certeza son artefactos. Más importante aún, se plantea la hipótesis de que hay sitios de unión a ligandos recientemente expuestos en la conformación de CFH estabilizada con PspCN y nos propusimos probar esta hipótesis a través de ensayos funcionales.

Nuevo sitio de unión para TED/C3d expuesto por la unión de PspCN a CFH

Se inmovilizaron C3b, C3c y C3d humanos purificados en plasma de origen comercial usando acoplamiento de amina estándar a diferentes canales del mismo chip C1 SPR (Biacore). Posteriormente, habiendo demostrado que PspCN no se une a C3b, C3c o C3d (datos no mostrados), las afinidades de CFH, o el complejo CFH: PspCN, para C3b junto con sus diversos productos de degradación se midieron en el mismo experimento (Figura 6). Se obtuvo una afinidad notablemente consistente por la C3b inmovilizada por CFH recombinante y purificado en plasma que coincide bien con los valores de K_D de la literatura de 0.5-0.6 mM (Tabla 1). Curiosamente, el complejo CFH:PspCN se unió consistentemente tres veces mejor a C3b, con una K_D = 0.15-0.2 mM. Se obtuvieron resultados prácticamente idénticos para PspCNR1 (datos no mostrados).

Se encuentra que CFH (solo) no se unía bien a C3c o C3d en el chip SPR (Figura 6). Esto concuerda bien con otros informes recientes [22, 23, 38]. Por otro lado, se ha establecido que el fragmento recombinante CFH 19-20 se une igualmente bien (y usando los mismos residuos de aminoácidos) a C3d y C3b con una K_D de ~2 μM [15, 31]. Claramente, el sitio de unión a C3b/C3d ubicado en CCP 19-20 no es completamente accesible dentro de CFH intacto en este ensayo basado en SPR. Es sorprendente, por lo tanto, que CFH: PspCN se une dos órdenes de magnitud mejor a C3d que CFH solo (Figura 6, Tabla 2). La K_D (2 μM) para esta interacción fue comparable con la de la unión de FH 19-20 a C3d o C3b. Este resultado es consistente con nuestra hipótesis de que la unión de PspCN provoca una reordenación conformacional de CFH que expone nuevos sitios de unión a ligandos.

Ensayos funcionales de CFH:PspCN

Dado que PspCN ha desarrollado la capacidad de unirse muy estrechamente a CFH y modificar su conformación, surge la pregunta, ¿qué efecto tiene la unión de PspCN en las propiedades funcionales de CFH como un inhibidor de la amplificación de C3b?. Se prueba su efecto sobre la actividad de aceleración del deterioro al ensamblar la convertasa en un chip SPR y observar cómo se disociaba en sus componentes antes y después de agregar CFH (o CFH: PspCN) (Figura 7). Es evidente que CFH 10 nM tiene una clara influencia de aceleración en el deterioro (como se esperaba), pero esto es superado aproximadamente dos veces por una mezcla de CFH 2.5 nM y PspCN 2.5 nM.

PspCN revela efectos crípticos de la mutación ligada a la enfermedad en CFH

Se produjeron en *P. pastoris* el mutante CFH (D1119G) (Figura 8A). Esta mutación vinculada a aHUS dentro de CCP 19 no se ha caracterizado previamente en el contexto de CFH de longitud completa purificado. Por otro lado, en el contexto del fragmento C-terminal, CFH 19-20, se informó que D1119G causa una pérdida casi total de la unión de C3d y C3b [39]. Además, dentro del complejo CFH 19-20:C3d D1119 ocupa una posición clave en la superficie interfacial intermolecular [39]. Curiosamente, se encontró que CFH (D1119G) se une a C3b en la superficie del chip SPR con aproximadamente la misma afinidad que CFH (wt) (Tabla 2). Como se esperaba, CFH (D1119G) no tenía una afinidad significativa por iC3b o C3d.

Se fabricó el complejo PspCN:CFH (D1119G) y se probó su unión a C3b y C3d. El complejo mostró alguna mejora, en comparación con CFH (D1119G) solo, en la unión a C3b (Tabla 2) pero, a diferencia del complejo CFH (wt): PspCN, no mostró mejora de la unión a C3d. De este modo, la unión de PspCN ha revelado una notable diferencia entre CFH (wt) y CFH (D1119G) que no fue evidente en un estudio de unión de C3b/C3d realizado en ausencia de PspCN en un chip SPR. Esto reafirma nuestra hipótesis de que PspCN puede desenterrar el sitio de unión C3d/C3b C-terminal parcial o completamente enterrado de CFH.

Luego se pregunta si el déficit latente en la capacidad de CFH (D1119G) para unirse al dominio TED de C3b, que puede ser desenmascarado por PspCN, tiene consecuencias para la capacidad de este mutante para acelerar el deterioro de C3b.Bb. Se encuentra que CFH (D1119G), por sí mismo, acelera la disociación de C3b.Bb tan bien como lo hace CFH (wt) (Figura 8B). Este resultado es consistente con la retención, en el CFH mutado, de la afinidad de unión a C3b de tipo casi salvaje (en un chip SPR). El mutante CFH, sin embargo, se comportó de manera notablemente diferente de CFH (wt) cuando estaba en complejo con PspCN; solo se registró una pequeña mejora en la tasa de aceleración del deterioro, en oposición a la mejora aproximadamente diez veces mayor observada en el caso de CFH de tipo salvaje al unirse a PspCN.

A continuación, se investigó el grado en que la mutación D1119G perturba el CFH de actuar sobre una superficie sustituta de la célula huésped. El CFH humano purificado en plasma, cuando se agrega al suero humano deficiente en CFH, protege a los eritrocitos de oveja (Figura 8C) (que, como los eritrocitos humanos, tienen superficies ricas en ácido siálico) pero no los eritrocitos de conejo (con superficies pobres en ácido siálico) (Figura 7D) de hemólisis mediada por complemento; esto es consistente con lo que se ha mostrado previamente [40]. Por otro lado, CFH (D1119G) (solo) no pudo proteger ni a los eritrocitos de conejo ni a los de oveja, lo que es coherente con un papel causal en el síndrome urémico hemolítico atípico. Esto muestra que a pesar de la unión de CFH (D1119G) como CFH (wt) a C3b en una superficie de sensorchip SPR, este mutante vinculado a la enfermedad no funciona tan bien como CFH (wt) en una autosuperficie. La adición de PspCN mejoró levemente la capacidad de CFH (D1119G) para proteger los eritrocitos de oveja (Figura 8C) consistente con la pequeña mejora antes mencionada en la unión a C3b de PspCN:CFH (D1119G) en comparación con CFH (D1119G). El complejo CFH: PspCN muestra solo un aumento modesto en la protección de los eritrocitos de conejo (pobres en ácido siálico) (Figura 8D) en comparación con el CFH

purificado en plasma solo. De este modo, a pesar de la disponibilidad inducida por PspCN del sitio de unión C3d/TED C-terminal en el CFH, el control de la amplificación de C3b en el eritrocito de conejo sigue siendo inadecuado. Claramente, la adopción por CFH de una conformación activada en el complejo PspCN:CFH no es suficiente: anclaje a la superficie celular a través del dominio de unión al colesterol de PspC intacto o, en una superficie del huésped, unión de CFH a ácidos siálicos (por ejemplo) también es un requisito.

Finalmente, se intentó recrear parcialmente el escenario de un individuo heterocigoto con la mutación CFH (D1119G) realizando los mismos ensayos de hemólisis usando una mezcla de CFH (wt) 1 μM y CFH (D1119G) 1 μM (Figuras 8C y RE). En este caso 1:1, como era de esperar, se obtuvieron altos niveles similares de hemólisis para los eritrocitos de conejo como se observó para CFH (wt) 2 μM; en presencia de PspCN, se observaron disminuciones moderadas similares en la hemólisis de eritrocitos de conejo tanto para la mezcla 1:1 como para CFH (wt). Curiosamente, sin embargo, la mezcla 1:1 "heterocigota" no pudo proteger completamente los eritrocitos de oveja de la lisis mediada por el complemento hasta que también se incluyó PspCN en la reacción. La PspCN por lo tanto, fue capaz de activar CFH en la mezcla 1:1 (equivalente a un individuo heterocigoto) lo suficiente como para inhibir la lisis.

Discusión

CFH es clave para el control de la amplificación de C3b que es el evento fundamental en la operación del sistema del complemento. Es esencial que CFH distinga entre C3b en las células huésped y en las foráneas. Es poco probable que esto sea únicamente una cuestión de enriquecimiento selectivo de CFH en aquellas superficies que requieren protección; eso permitiría que CFH sea fácilmente secuestrado por microbios, haciendo que el sistema del complemento sea prácticamente inútil como primera línea de defensa contra la infección. De este modo, CFH puede haber evolucionado para "ocultar" algunos de sus sitios reguladores del complemento y revelarlos solo en presencia de ciertos marcadores moleculares. Se especula que dicha estrategia tan hipotética podría explicar por qué CFH tiene tantos módulos de CCP que no parecen unirse directamente a los ligandos. Podrían permitir que CFH adopte diferentes conformaciones, exponiendo diferentes sitios de unión a ligandos, en respuesta a firmas moleculares específicas de la superficie. Los resultados presentados aquí, en base a una investigación del complejo formado entre PspCN y CFH, respaldan firmemente dicho modelo.

Se demostró, usando SPR, que los residuos de 104 aminoácidos N-terminales de PspC de *S. pneumoniae* (D39) (residuos 37-140 de la proteína procesada previamente) son suficientes para unirse irreversiblemente, en la escala de tiempo biológica, a CFH humano recombinante así como a CFH humano purificado de sangre. Esta observación está de acuerdo con la unión previamente informada de CFH purificado en plasma (Lu L, Ma Y, Zhang JR. Streptococcus pneumoniae recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA. J Biol Chem. 2006 Jun 2;281(22):15464-74), a una construcción N-terminal de longitud similar de PspCN, que se evaluó en solución usando calorimetría de titulación isotérmica y se encontró que era demasiado apretada para medir (<1 nM). Nuestro complejo de PspCN:CFH es significativamente más estable que el complejo observado en un experimento basado en SPR previamente realizado usando una construcción de PspC ligeramente extendida (residuos 39-152) (Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of Streptococcus pneumoniae and mediates adhesion to host epithelial cells. J Immunol. 2007 May 1;178(9):5848-58). Por otro lado, no se observó ninguna pérdida o ganancia de afinidad por una construcción significativamente más larga (residuos 39-259) y es probable que PspCN abarque la totalidad del sitio de unión a CFH dentro de PspC de longitud completa.

El CFH derivado del plasma tiene ocho de nueve sitios potenciales de N-glicosilación, principalmente en CCP centrales, ocupados por glicanos bi-antenales bi-sialilados (Fenaille F, Le Mignon M, Groseil C, Ramon C, Riandé S, Siret L, Bihoreau N. Sitespecific N-glycan characterization of human complement factor H. Glycobiology. 2007 Sep;17(9):932-44). El CFH recombinante usado en este estudio (tanto de tipo salvaje como D1119G) había sido desglicosilado enzimáticamente. El hecho de que todas estas versiones de CFH tengan afinidades comparables por PspCN muestra que los N-glucanos de CFH en plasma no juegan un papel significativo en la unión de PspCN. También parecían no ser esenciales para la unión a C3b o para participar en una gama de ensayos llevados a cabo *in vitro* (Jouvin MH, Kazatchkine MD, Cahour A, Bernard N. Lysine residues, but not carbohydrates, are required for the regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement. J Immunol. 1984 Dec;133(6):3250-4).

Suponiendo que PspC en la superficie bacteriana tiene una afinidad similar a PspCN por CFH, entonces la bacteria adquirirá y retendrá, presumiblemente durante el tiempo que pase en el torrente sanguíneo, una molécula de CFH unido a cada una de sus moléculas de PspC exhibidas en la superficie. Se ha sugerido (Agarwal V, Asmat TM, Luo S, Jensch I, Zipfel PF, Hammerschmidt S. Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. J Biol Chem. 2010 Jul 23;285(30):23486-95; Quin LR, Onwubiko C, Moore QC, Mills MF, McDaniel LS, Carmicle S. Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines *in vitro* and enhances invasion of mouse lungs *in vivo*. Infect Immun. 2007 Aug;75(8):4082-7) que *S. pneumoniae* usa esta molécula no solo para evitar la amplificación de C3b sino también, como preparación para la invasión, para la localización en las superficies de las células huésped que llevan ligandos para el CFH. Por lo tanto, era interesante aprender más sobre las propiedades estructurales y funcionales de este complejo notablemente estrecho.

En base a tres enfoques ortogonales: afinidades de unión de mutantes de truncamiento, perturbaciones de desplazamiento químico de RMN y reticulación química, descubrimos que PspCN se une muy estrechamente a la

región media de CFH en un sitio dentro de las CCP 8-10. No obtuvimos evidencia de una participación directa significativa de otros CCP. No obstante, el CFH de longitud completa se une a PspCN mucho más fuertemente que el FH 8-15, por lo que está claro que otros CCP desempeñan un papel, aunque indirecto, en la formación compleja como se analiza más adelante. Nuestros resultados coinciden con un estudio de citometría de flujo (Dave S, et al. 2004) que implicaba que algunos o todos las CCP 6-10 eran cruciales para la unión de CFH, a los aislados *Pneumococcal* de 14 cepas diferentes, a través de los 225 aminoácidos N-terminal de PspCN. Nuestros resultados también están en gran parte de acuerdo con Hammerschmidt et al (Hammerschmidt S, et al. 2007) que usaron un segmento de 250 residuos de PspC de la cepa ATCC 33400 (serotipo 1) que llamaron SH2. Mostraron por dot blot y por SPR (aunque no se informaron valores de K_D) que las CCP 8-11 se unen a SH2 mientras que FH 1-7, FH 11-15 y FH 16-20 no mostraron o una unión muy pequeña a SH2. Estos autores demostraron que la heparina (que interactúa con las CCP 7 y 20 de CFH, pero también se une a PspCN según nuestras observaciones) inhibe la interacción SH2-CFH, mientras que un anticuerpo monoclonal para CCP 19-20 inhibe la unión de SH2 a FH 8-20. Esto sugirió a los autores que un segundo sitio directo de unión a PspCN debe ubicarse en los módulos C-terminal. Nuestros estudios (aunque demuestran una interacción FH 19-20: PspCN muy débil) sugieren que es más probable que estos inhibidores funcionen indirectamente al bloquear un componente intramolecular del complejo binario, como se analiza más adelante. Otro estudio (Duthy TG, et al. 2002) también informó la unión (por ELISA) de FH 8-15 y FH 8-13, pero no FH 1-7, FH 10-12 o FH 16-20, a PspC, que coincide con nuestros datos. Sin embargo, no pudieron detectar la unión para FH 8-12, y solo la unión débil a FH 8-14, y de este modo asignaron el sitio de unión a FH 13-15. Todas sus construcciones se produjeron como mutantes de truncamiento recombinante en *P. pastoris*, como las del estudio actual, pero los rendimientos fueron muy bajos, por lo que la autenticación habría sido difícil. En resumen, ahora hay múltiples líneas de evidencia que respaldan el compromiso directo por PspC de los módulos 8-10 en CFH que están libres de sitios de unión para C3b, GAG u otros ligandos conocidos. Esto sería coherente con la noción de que beneficia a la bacteria para dejar estos sitios disponibles.

La tasa de depreciación insignificante y, por consiguiente, una afinidad notablemente alta del complejo CFH:PspCN se puede derivar de la adopción de nuevas conformaciones estables, mutuamente dependientes, por ambos socios proteínicos tras la formación del complejo. De este modo, aunque su MW es de solo 11 kD y, por consiguiente, solo puede contactarse con unas pocas CCP simultáneamente, PspCN se une extremadamente estrechamente a CFH (155 kD) y este dominio se convierte en una proteína plegada en el procedimiento (no se ha investigado si este dominio es plegado cuando es parte de la proteína PspC intacta).

CFH de longitud completa se une a PspCN aproximadamente cuatro órdenes de magnitud más fuertemente que CFH 8-9, y tres órdenes de magnitud más fuertemente que CFH 8-15. Esto a pesar de la falta de evidencia de nuestros estudios de que las CCP distintas de 8, 9 y 10 participan directamente en la unión de PspCN. La reticulación nos dice que la unión de PspCN provoca cambios importantes en la estructura de la proteína más grande. Debido a su arquitectura extendida y flexible, y al potencial consiguiente de interacciones entre módulos CCP no vecinos, el CFH libre tiene múltiples posibilidades de conformación; el resultado obtenido sugiere que algunos de estos son más estables que otros, pero están separados entre sí por barreras de energía de activación relativamente altas. La unión de PspCN podría inducir la formación de un conformador estable no accesible cinéticamente para CFH en ausencia de PspCN. La existencia de dicha conformación sugiere que los marcadores moleculares específicos de autosuperficie (tales como GAG y ácido siálico) también podrían actuar para facilitar las transiciones entre los conformadores de CFH a través de una estrategia similar. La observación interesante de que otras proteínas bacterianas (a diferencia de PspC) se unen directamente a las mismas regiones de CFH (CCP 7 y 20) (Ferreira VP, Pangburn MK, Cortés C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. Mol Immunol. 2010 Aug;47(13):2187-97) al igual que los marcadores moleculares de la superficie del huésped (Schmidt CQ, Herbert AP, Kavanagh D, Gandy C, Fenton CJ, Blaum BS, Lyon M, Uhrín D, Barlow PN. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. J Immunol. 2008 Aug 15;181 (4):2610-9) indica que ellos también podrían actuar de esta manera.

Los resultados discutidos hasta ahora se refieren a reticulaciones observadas en un complejo PspCN:CFH 1:1. Esta es la especie dominante en una mezcla de CFH y PspCN según el análisis de SEC-MALS (cargado en la columna de exclusión por tamaño a 500 mg mL^{-1} o ~3 mM). Sin embargo, los datos de reticulación indicaron que PspCN aumentó la tendencia de CFH a formar dímeros en los que las CCP 5 y 7 (presumiblemente de diferentes monómeros) se unen y también existe una reticulación específico de dímero entre las CCP 18 y 20. Si bien dos moléculas de CFH podrían interactuar directamente con la misma molécula de PspCN, esto parece poco probable dado el pequeño tamaño de PspCN y su gran superficie de interacción con las CCP 8-9 en lo que parecía ser el complejo 1:1 observado en las muestras de RMN. Por otro lado, es factible que la conformación alterada de CFH estabilizada por PspCN resulte en la exposición de regiones previamente enterradas de CFH que participan en una autoasociación débil que puede ser capturada por reticulación; en basado a las reticulaciones específicos de dímero observados, es probable que estos involucren CCP 5-7 y posiblemente CCP 18-20. Este efecto puede ser producto de encuentros (capturados por reticulación) entre dos complejos solubles de PspCN:CFH. Este resultado es paralelo a un informe anterior de que los sustitutos de GAG solubles, tales como heparina, inducen la oligomerización de CFH soluble que no podría explicarse por las múltiples moléculas de CFH que se unen al mismo GAG, y que también podrían haber surgido de complejos de CFH:GAG solubles autoasociación a través de sitios expuestos nacientes. No se sabe si se forman dímeros CFH/PspC en la superficie bacteriana.

En este estudio se usaron SPR para medir la afinidad de FH y FH:PspCN para C3b químicamente inmovilizado en una superficie carboximetilada de un sensorchip. Esta configuración experimental es probablemente un modelo muy pobre de una autosuperficie, y por consiguiente, las afinidades observadas en el caso de SPR pueden ser similares a las que se observarían en una superficie de activación del complemento "aleatoria" (tales como un microbio). En el estudio actual, tanto el CFH recombinante como el purificado en plasma interactuaron con C3b, inmovilizados en la superficie de un sensorchip SPR, con una K_D (0.6 mM) que está en línea con otros valores informados. Esto es 15 veces más apretado y cuatro veces más apretado, respectivamente, en comparación con ya sea FH 1-4 (K_D = ~10 mM) o FH 19-20 (K_D = 2-3 mM) (Schmidt CQ, Herbert AP, Kavanagh D, Gandy C, Fenton CJ, Blaum BS, Lyon M, Uhrín D, Barlow PN. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. J Immunol. 2008 Aug 15;181 (4):2610-9). También estuvimos de acuerdo con los autores de estudios anteriores [38 y 22] en nuestra observación de que el CFH de longitud completa se une mal a C3d inmovilizada en el sensorchip SPR cuando se compara con ya sea CFH o CFH 19-20 que se une a C3b, o CFH 19- 20 que se une a C3d. Es de destacar que en estudios anteriores, C3b se depositó en el chip de diversas maneras, incluso a través de su tioéster, y se obtuvieron resultados similares [39]. De este modo, el sitio de unión de C3b/TED en el extremo C del CFH intacto no está completamente disponible cuando se presenta CFH con C3d en la superficie del chip SPR.

Esto plantea la importante pregunta de si el sitio de unión C3b/d C-terminal de CFH, que no está disponible para unirse a C3d, se despliega sin embargo después de un encuentro entre CFH y C3b. Curiosamente, en el estudio actual, CFH (D1119G) se une a C3b en el sensorchip SPR casi tan bien como CFH (wt), a pesar del hecho que el fragmento CFH 19-20 (D1119G) prácticamente no tiene afinidad por C3b o C3d [39]. Esto sugiere que en los ensayos basados en SPR de la unión de CFH a C3b (así como a los que miden la unión a C3d), el sitio C-terminal no contribuye de manera eficaz. Por otro lado, CFH (D1119G) (como CFH (wt)) se une quince veces más fuerte que CFH 1-4. Puede ser que las CCP adicionales (esto es, entre las CCP 5 y 18) contribuyan a la interacción intermolecular y, de hecho, se demostró anteriormente que el CFH 6-8 recombinante se une muy débilmente a C3b [15] y Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S. Cada uno de los tres sitios de unión en el factor H del complemento interactúa con un sitio distinto en C3b. J Biol Chem. 2000 Sep 8;275(36):27657-62). De manera alternativa, el complejo CFH: C3b podría verse favorecido por las interacciones intramoleculares que están ausentes en CFH libre (por analogía con el complejo CFH: PspCN). En cualquier caso, podemos concluir que el sitio de unión C-terminal C3b/C3d en CFH de longitud completa está, por defecto, enmascarado u ocluido.

En contraste, está claro que el sitio de unión C3b/C3d está disponible en el complejo CFH: PspCN, ya que esta es la única explicación coherente para su unión a C3d > 50 veces mejor, en comparación con CFH intacto, que equivale a la afinidad de unión a C3d de FH 19-20. Además, la unión en dos sitios de CFH: PspCN a C3b también ayuda a explicar su afinidad relativamente alta por C3b (60 veces mayor que por FH 1-4 solo y 18 veces mayor que FH 19-20 solo). Aunque la diferencia en las afinidades (para C3b) entre CFH y CFH: PspCN es "solo" cuatro veces, esto podría ser muy significativo para la bacteria. Si se capturara CFH en su conformación "latente", una K_D de 0.6 μM (para el complejo C3b: CFH) podría ser inadecuado para el control de la amplificación de C3b, que es un procedimiento binario de encendido-apagado capaz de abrumar a los reguladores una vez que se rompe el umbral de población de C3b; por otro lado, una K_D de 0.15 μM para el complejo CFH: PspCN-C3b puede ser suficiente para mantener el número de moléculas de C3b atadas en la superficie por debajo del umbral para la activación de la fuga. Dicha noción, junto con la mejora de diez veces en la actividad de aceleración del deterioro, es consistente con las propiedades de prevención de hemólisis significativamente mejoradas del CFH unido a PspCN observada en el presente estudio. La capacidad de PspCN para restaurar la protección contra la hemólisis en suero empobrecido en CFH suplementado con una mezcla 1:1 de CFH (tipo salvaje) y CFH (D1119G) sugiere su potencial terapéutico.

Estas observaciones sugieren fuertemente que otras proteínas bacterianas inducen la misma o similar conformación activada de CFH a la inducida por la unión de PspCN. La gran mayoría de las proteínas bacterianas se unen a CFH en otros lugares, pero podrían estabilizar una conformación similar. La reticulación muestra que las CCP 7 y 20 están muy juntas en el complejo PspCN y muchas proteínas bacterianas se involucran en estos dos sitios, potencialmente uniéndolos. Por lo tanto, será importante explorar las estructuras de otras proteínas bacterianas: complejos de CFH usando métodos similares a los que hemos implementado en el estudio actual. Una posibilidad adicional tentadora es que los marcadores moleculares en las autosuperficies estabilizan la misma conformación activada de CFH. Es de destacar que los marcadores polianiónicos (modelados experimentalmente por heparina) se unen a las CCP 7 y 20 [15], mientras que más recientemente, los epítopos específicos de oxidación (que se cree que son importantes para reclutar CFH a las células dañadas) también interactúan con estas dos CCP[34]. Esta posibilidad resalta la importancia del uso de superficies biomiméticas para evaluar las repercusiones funcionales de los SNP y las mutaciones vinculados a la enfermedad en CFH porque de lo contrario se perderá algo, como se ejemplifica en este documento con nuestro estudio de unión a C3b de CFH(D1119G).

En conclusión, ahora hay pruebas sólidas para sugerir que CFH circula en forma latente en la que parte de su capacidad de unión a C3b está bloqueada, evitando que sea un regulador altamente eficaz de la amplificación de C3b y, por lo tanto, apague espontáneamente la activación del complemento por completo. El factor H también puede existir en una forma "activa" en la que sus sitios de unión a C3b están disponibles y yuxtapuestos de tal manera que se unan de forma bivalente y, por lo tanto, con avidez a su objetivo C3b (o C3b.Bb). La proteína bacteriana PspC puede inducir esta conformación activa y es factible que otras proteínas bacterianas utilicen el mismo truco (aunque a través de una forma diferente de compromiso con CFH). Que dicha conformación exista, y sea explotada por bacterias,

es altamente sugestiva de que también sea la conformación activa en las autosuperficies. Ahora se necesitan estudios adicionales para probar si esta es realmente la base molecular de la discriminación auto versus no auto por parte del regulador soluble clave del sistema del complemento de vertebrados.

Referencias para el ejemplo 1

1. Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2013) Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms, Journal of immunology 190, 3831-3838.

2. Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2013) Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions, Journal of immunology 190, 3839-3847.

3. Lachmann, P. J. (2009) The amplification loop of the complement pathways, Adv Immunol 104, 115-149.

4. Gadjeva, M., Dodds, A. W., Taniguchi-Sidle, A., Willis, A. C., Isenman, D. E., and Law, S. K. (1998) The covalent binding reaction of complement component C3, Journal of immunology 161, 985-990.

5. Schmidt, C. Q., Herbert, A. P., Hocking, H. G., Uhrin, D., and Barlow, P. N. (2008) Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Structural and functional correlations for factor H, Clin Exp Immunol. 151, 14-24.

6. Ferreira, V. P., Pangburn, M. K., and Cortes, C. (2010) Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate, Mol Immunol 47, 2187-2197.

7. Perkins, S. J., Nan, R., Li, K., Khan, S., and Miller, A. (2011) Complement Factor H-ligand interactions: Selfassociation, multivalency and dissociation constants, Immunobiology.

8. Makou, E., Herbert, A. P., and Barlow, P. N. (2013) Functional Anatomy of Complement Factor H, Biochemistry.

9. Ripoche, J., Day, A. J., Harris, T. J., and Sim, R. B. (1988) The complete amino acid sequence of human complement factor H, Biochem J. 249, 593-602.

10. Soares, D. C., and Barlow, P. N. (2005) Complement Control Protein Modules in the Regulators of Complement Activation, In Structural Biologyof the Complement System (Morikis, D., and Lambris, J. D., Eds.), pp 19-62, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

11. Matsumoto, A. K., Kopicky-Burd, J., Carter, R. H., Tuveson, D. A., Tedder, T. F., and Fearon, D. T. (1991) Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19, The Journal of experimental medicine 173, 55-64.

12. de Cordoba, S. R., and de Jorge, E. G. (2008) Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H, Clin Exp Immunol. 151, 1-13.

13. Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I., Hageman, J. L., Stockman, H. A., Borchardt, J. D., Gehrs, K. M., Smith, R. J., Silvestri, G., Russell, S. R., Klaver, C. C., Barbazetto, I., Chang, S., Yannuzzi, L. A., Barile, G. R., Merriam, J. C., Smith, R. T., Olsh, A. K., Bergeron, J., Zernant, J., Merriam, J. E., Gold, B., Dean, M., and Allikmets, R. (2005) A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 7227-7232. Epub 2005 May 7223.

14. Blackmore, T. K., Sadlon, T. A., Ward, H. M., Lublin, D. M., and Gordon, D. L. (1996) Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H, Journal of immunology 157, 5422-5427.

15. Schmidt, C. Q., Herbert, A. P., Kavanagh, D., Gandy, C., Fenton, C. J., Blaum, B. S., Lyon, M., Uhrin, D., and Barlow, P. N. (2008) A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H, Journal of immunology 181, 2610-2619.

16. Clark, S. J., Bishop, P. N., and Day, A. J. (2010) Complement factor H and age-related macular degeneration: the role of glycosaminoglycan recognition in disease pathology, Biochem Soc Trans 38, 1342-1348.

17. Clark, S. J., Ridge, L. A., Herbert, A. P., Hakobyan, S., Mulloy, B., Lennon, R., Wurzner, R., Morgan, B. P., Uhrin, D., Bishop, P. N., and Day, A. J. (2013) Tissue-specific host recognition by complement factor h is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions, Journal of immunology 190, 2049-2057.

18. Richards, A., Buddies, M. R., Donne, R. L., Kaplan, B. S., Kirk, E., Venning, M. C., Tielemans, C. L., Goodship, J. A., and Goodship, T. H. (2001) Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition, Am J Hum Genet 68, 485-490.

19. Gordon, D. L., Kaufman, R. M., Blackmore, T. K., Kwong, J., and Lublin, D. M. (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H, J Immunol. 155, 348-356.

20. Appel, G. B., Cook, H. T., Hageman, G., Jennette, J. C., Kashgarian, M., Kirschfink, M., Lambris, J. D., Lanning, L., Lutz, H. U., Meri, S., Rose, N. R., Salant, D. J., Sethi, S., Smith, R. J., Smoyer, W., Tully, H. F., Tully, S. P., Walker, P., Welsh, M., Wurzner, R., and Zipfel, P. F. (2005) Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update, J Am Soc Nephrol 16, 1392-1403.

21. Fridkis-Hareli, M., Storek, M., Mazsaroff, I., Risitano, A. M., Lundberg, A. S., Horvath, C. J., and Holers, V. M. (2011) Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases, Blood 118, 4705-4713.

22. Schmidt, C. Q., Bai, H., Lin, Z., Risitano, A. M., Barlow, P. N., Ricklin, D., and Lambris, J. D. (2013) Rational Engineering of a Minimized Immune Inhibitor with Unique Triple-Targeting Properties, Journal of immunology Jun 1;190(11):5712-21.

23. Hebecker, M., Alba-Dominguez, M., Roumenina, L. T., Reuter, S., Hyvarinen, S., Dragon-Durey, M. A., Jokiranta, T. S., Sanchez-Corral, P., and Jozsi, M. (2013) An Engineered Construct Combining Complement Regulatory and Surface-Recognition Domains Represents a Minimal-Size Functional Factor H, Journal of immunology.

24. Blom, A. M., Hallstrom, T., and Riesbeck, K. (2009) Complement evasion strategies of pathogens-acquisition of inhibitors and beyond, Mol Immunol 46, 2808-2817.

25. Zipfel, P. F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S. T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M., and Remuzzi, G. (2002) Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases, Biochem Soc Trans 30, 971-978.

26. Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjoholm, A. G., Pozzi, G., and Bjorck, L. (2000) Hic, a novel surface protein of Streptococcus pneumoniae that interferes with complement function, The Journal of biological chemistry 275, 37257-37263.

27. Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M. K., and McDaniel, L. S. (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H, Infection and immunity 69, 3435-3437.

28. Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Bjorck, L., and Meri, S. (2002) Streptococcus pneumoniae evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the pspC locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H, Journal of immunology 168, 1886-1894.

29. Hyams, C., Trzcinski, K., Camberlein, E., Weinberger, D. M., Chimalapati, S., Noursadeghi, M., Lipsitch, M., and Brown, J. S. (2012) Streptococcus pneumoniae capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor H binding and opsonisation with C3b/iC3b, Infection and immunity.

30. Bexborn, F., Andersson, P. O., Chen, H., Nilsson, B., and Ekdahl, K. N. (2008) The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H2O)Bb), Mol Immunol 45, 2370-2379.

31. Kirkitadze, M. D., and Barlow, P. N. (2001) Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation, Immunol Rev 180, 146-161.

32. Trouw, L. A., Bengtsson, A. A., Gelderman, K. A., Dahlback, B., Sturfelt, G., and Blom, A. M. (2007) C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack, The Journal of biological chemistry 282, 28540-28548.

33. Leffler, J., Herbert, A. P., Norstrom, E., Schmidt, C. Q., Barlow, P. N., Blom, A. M., and Martin, M. (2010) Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells, The Journal of biological chemistry 285, 3766-3776.

34. Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K. L., Scholl, H. P., Charbel Issa, P., Cano, M., Brandstatter, H., Tsimikas, S., Skerka, C., Superti-Furga, G., Handa, J. T., Zipfel, P. F., Witztum, J. L., and Binder, C. J. (2011) Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress, Nature 478, 76-81.

35. Schmidt, C. Q., Slingsby, F. C., Richards, A., and Barlow, P. N. (2011) Production of biologically active complement factor H in therapeutically useful quantities, Protein Expr Purif 76, 254-263.

36. Pangburn, M. K. (2002) Cutting edge: localization of the host recognition functions of complement factor H at the carboxyl-terminal: implications for hemolytic uremic syndrome, Journal of immunology 169, 4702-4706.

37. Blaum, B. S., Deakin, J. A., Johansson, C. M., Herbert, A. P., Barlow, P. N., Lyon, M., and Uhrin, D. (2010) Lysine and arginine side chains in glycosaminoglycan-protein complexes investigated by NMR, cross-linking, and mass spectrometry: a case study of the factor H-heparin interaction, Journal of the American Chemical Society 132, 6374-6381.

38. Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J. J., Malik, T. H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B. P., Harris, C. L., Pickering, M. C., and Lea, S. M. (2013) Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 4685-4690.

39. Morgan, H. P., Schmidt, C. Q., Guariento, M., Blaum, B. S., Gillespie, D., Herbert, A. P., Kavanagh, D., Mertens, H. D., Svergun, D. I., Johansson, C. M., Uhrin, D., Barlow, P. N., and Hannan, J. P. (2011) Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface, Nat Struct Mol Biol 18, 463-470.

40. Kazatchkine, M. D., Fearon, D. T., and Austen, K. F. (1979) Human alternative complement pathway: membraneassociated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b, Journal of immunology 122, 75-81.

Ejemplo 2 - Investigación adicional de PspCN y proteínas relacionadas

Se realizó un trabajo adicional para investigar las propiedades de PspCN, las variantes de PspCN y los usos terapéuticos de tales proteínas (que no forman parte de la invención reivindicada).

Métodos:

Protección contra la hemólisis de eritrocitos similares a PNH

Se prepararon eritrocitos humanos similares a PNH según una versión modificada de Ezzell *et al.* (1991). Brevemente, se obtuvo sangre humana completa de los donantes mediante flebotomía y se almacenó en la solución de Alsever a 4 ºC. Las células se lavaron tres veces con solución reguladora de lavado RBC (HEPES 20 mM; NaCl 145 mM; EDTA 10 mM; gelatina al 0.1% p/v, pH 7.3) y se resuspendieron después del lavado final en PBS. Después de cada etapa de lavado, se aspiró el 10% superior del sedimento celular para eliminar la capa leucocitaria que contenía glóbulos blancos. Se agregó una alícuota de 1 ml de células empaquetadas a una solución al 8% p/v de solución de bromuro de 2-aminoetilisotiouronio (AET, Sigma-Aldrich) que se había titulado a pH 8.0 usando HCl. La suspensión celular se incubó durante nueve minutos a 37 ºC con agitación constante, después de lo cual las células se lavaron tres veces con solución reguladora de lavado RBC que no contenía EDTA.

Luego las células similares a PNH se lavaron una vez con HEPES 20 mM; NaCl 145 mM; gelatina al 0.1% p/v, pH 6.4. Estas células se incubaron luego a 37 ºC con suero humano normal acidificado, EGTA de magnesio 5 mM, y la concentración apropiada de ya sea CFH purificado en plasma (Complement Technology) o PspCN recombinante purificado en un volumen de reacción total de 50 µl. Después de 30 minutos, la reacción se inactivó mediante la adición de 200 µl de solución reguladora de enfriamiento con hielo (HEPES 20 mM; NaCl 145 mM; EDTA 10 mM; gelatina al 0.1% p/v; pH 7.3). Las células y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 3,000xg durante 10 minutos a 4 ºC, después de lo cual se retiró una alícuota de 100 µl y se registró su absorbancia a 410 nm.

Determinación de la secuencia mínima de PspC necesaria para la unión del factor H

Construcciones que contienen la secuencia de codificación de PspC(52-140), PspC(62-140), PspC(72-140), PspC(37-130), PspC(37-120) y PspC(37-110) se produjeron según el método usado para hacer la secuencia PspCN (37-140). Luego se evaluó la unión a CFH usando el mismo ensayo SPR que se había desarrollado para determinar la afinidad de unión a CFH de la proteína PspCN (37-140).

Modificación de PspCN

Los términos N y C de PspCN se modificaron para contener una cisteína y un segmento enlazante de péptido flexible. En el caso de la PspCN Cys modificada terminalmente en N (Cys-PspCN) los residuos adicionales incluidos fueron: CGSGSGSGSGG-PspCN (SEQ ID NO 7), y en el caso de la PspCN Cys modificada terminalmente en C (PspCN-Cys) los residuos adicionales incluidos fueron: PspCN-GSGSGSGSGGC* (SEQ ID NO 8). Estas versiones modificadas de PspCN se clonaron y expresaron como proteínas de fusión SUMO en *E. coli* usando los mismos métodos que se habían desarrollado para PspCN. La purificación de estas proteínas también fue similar a la usada para PspCN con la excepción de que se incluyó tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante todas las etapas de purificación para preservar los grupos tiol de los residuos de cisteína.

Experimentos SPR para determinar si las proteínas mutadas por Cys retienen la capacidad de unión a FH

Se realizó SPR usando His-SUMO-Cys-PspCN e His-SUMO-PspCN-Cys como el ligando en experimentos SPR y CFH purificado en plasma disponibles comercialmente (Complement Technology, Tyler TX), usando el mismo método que el usado para evaluar la capacidad de unión a CFH de sPspCN.

PEGilación de Cys-PspCN

Se mezcló Cys-PspCN con un exceso molar de 20 veces de metoxi-PEG-maleimida (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 2.5 h a temperatura ambiente con agitación en PBS suplementado con TCEP 1 mM. Partes alícuotas de los

Cys-PspCN supuestamente PEGilados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se consideró exitosamente que la proteína PEGilada era aquella que mostraba un cambio de banda con respecto a la proteína no tratada.

Cuantificación de los niveles de CFH en suero humano normal

Los ensayos de estilo ELISA para cuantificar los niveles de CFH en suero humano normal se llevaron a cabo en placas estándar de fondo plano de 96 pocillos. Los pocillos se recubrieron con sPspCN (100 µl; 8 µg/ml) durante la noche a 4 ºC y posteriormente se bloquearon usando solución salina regulada con fosfato (PBS) suplementada con leche en polvo sin grasa al 5% p/v. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% v/v. Luego, los pocillos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1:800 del anticuerpo primario (OX24-Biotin (Lifespan Biosciences LS-C62878)). Luego, los pocillos se lavaron tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% v/v. Luego se incubaron los pocillos durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1:250 de polímero de estreptavidina-peroxidasa ultrasensible (Sigma-Aldrich S-2438). Luego los pocillos se lavaron tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% v/v. Los pocillos se incubaron durante 20 minutos con sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) seguido de la adición de un volumen igual de H_2SO_4 2.5 M. La absorbancia de los pocillos se leyó a 490 nm.

Resultados:

PspCN es capaz de inhibir la hemólisis de los eritrocitos "tipo PNH" mediante suero acidificado. Los resultados del ensayo de hemólisis en las figuras 9A y B muestran que la hemólisis se puede inhibir de manera eficaz mediante la adición de CFH. Además, la adición de PspCN a la reacción inhibió la hemólisis aún más eficientemente (con un valor de IC_{50} calculado como 28 nM). La explicación más probable para esta observación, cuando se combina con los resultados de los resultados de los ensayos de unión de CFH a C3b y C3d, es que la adición de PspCN activa el CFH endógena en el suero.

La secuencia mínima necesaria para la unión del factor H de tipo salvaje es 62-140

Los sensorgramas mostrados en las figuras 10 A-F muestran que el truncamiento de PspCN (residuos 37-140) del extremo C causa una disminución en la afinidad de unión de al menos tres órdenes de magnitud, mientras que es posible eliminar al menos 24 residuos del extremo N y aun así mantener una afinidad de unión a CFH muy alta. Por otro lado, la proteína PspC (71-140) muestra una disminución en la unión de al menos tres órdenes de magnitud. Queda por confirmar que la construcción 62-140 también conserva la capacidad de estabilizar CFH en la conformación activada.

PspCN modificada con Cys se une al factor H con una afinidad similar a la PspCN de secuencia nativa

La forma de las curvas mostradas en la figura 11 indica que, como es el caso de PspCN de tipo salvaje, tanto Cys-PspCN (Figura 10 A) como PspCN-Cys (Figura 10 B) tienen la capacidad de se unen irreversiblemente de manera eficaz a CFH, sin mostrar una tasa de apagado detectable. El análisis cinético de las interacciones de Cys-PspCN y PspCN-Cys realizadas con el software de evaluación Biacore, sugirió que la K_D para la interacción sea de aproximadamente 10^{-13} M (aunque la interacción era demasiado estrecha para calcular una K_D precisa usando SPR). Esta K_D calculada es del mismo orden de magnitud que la calculada para PspCN no modificada.

Adicionalmente, la figura 15 muestra que el acoplamiento de PspCN etiquetada con cisteína a una superficie a través del grupo tiol no perjudica su afinidad de unión a CFH.

Además, con referencia a la figura 16, la proteína PspCN etiquetada con cisteína muestra una actividad de aceleración del deterioro similar a PspCN sin una etiqueta de cisteína. Por lo tanto, se ha demostrado que la presencia de una etiqueta de cisteína en PspCN tiene un efecto mínimo sobre la interacción entre PspCN y CFH.

Cys-PspCN se puede PEGilar de manera eficaz con metoxi-PEG-maleimida

Metoxi-PEG-maleimida se acopla de manera eficaz a Cys-PspCN en condiciones leves como se puede ver en la figura 12 por un cambio en la movilidad bajo SDS-PAGE. La banda inferior, que migra entre los marcadores de 15 kDa y 20 kDa representa PspCN sin modificar. Después de la reacción de PEGilación, todavía hay una cantidad significativa de PspCN que permanece sin PEGilar. La banda superior, que migra justo por encima del marcador de 25 kDa, por otro lado, representa PspCN que se ha PEGilado con éxito. Hay poca evidencia de la formación de dímeros unidos por disulfuro de PspCN, o especies de PspCN con múltiples unidades estructurales de PEG. En general, este método de PEGilación de PspCN dio un rendimiento aproximado del 50% de PspCN PEGilado; se necesitarían más estudios cuantitativos para determinar el porcentaje de rendimiento con mayor precisión.

El CFH se puede cuantificar de manera eficaz usando PspCN en un ensayo de "estilo ELISA".

Se usó CFH (Complement Technology) purificado en plasma, a concentraciones conocidas, para construir una curva estándar (Figura 13), que proporcionó una buena detección lineal en al menos dos órdenes de magnitud. Cuando se

compara con la curva estándar, se pudieron determinar los niveles de CFH en suero humano normal y se encontró que estaban dentro del intervalo de referencia actualmente aceptado.

Preparación de la resina de cromatografía de afinidad de PspCN.

PspCN (37-140) modificada para contener un residuo Cys N-terminal y un enlazante compuesto por los residuos GSGSGSGSGG (Cys-PspCN) se acopló a la resina de cromatografía de yodoacetilo Ultralink (Thermo Scientific) a través de su residuo Cys N-terminal. El acoplamiento se realizó en base a las instrucciones del fabricante. La resina de yodoacetilo Ultralink (10 ml) se lavó con 50 ml de solución reguladora de acoplamiento (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8.5) usando una columna de cromatografía alimentada por gravedad. Una solución de Cys-PspCN (20 ml a 2 mg/ml) en solución reguladora de acoplamiento suplementado con TCEP 2.5 mM se mezcló con la resina de yodoacetilo Ultralink durante 15 minutos a temperatura ambiente en una columna de cromatografía alimentada por gravedad. Luego la columna se mantuvo en posición vertical y se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. El Cys-PspCN no unido se eliminó entonces drenando la fase fluida y lavando la columna con 30 ml de solución reguladora de acoplamiento. Para bloquear los grupos de yodoacetilo sin reaccionar en la resina, la resina se mezcló luego con 20 ml de L-cisteína.HCl 50 mM en solución reguladora de acoplamiento durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego la columna se mantuvo en posición vertical y se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La resina se lavó luego con 60 ml de NaCl 1 M seguido de 60 ml de solución salina regulada con fosfato (PBS) suplementada con NaN_3 al 0.05%. Usando este método, se acoplaron aproximadamente 1-1.5 mg de Cys-PspCN a cada ml de resina.

Purificación de FH a partir de plasma humano

El plasma humano (grupo mixto normal) en la solución de Alsever se adquirió de TCS Biosciences. La resina de PspCN (5 ml) se incubó con 100 ml de plasma humano a 4 ºC, durante 1 hora. Después de la incubación, la mezcla se aplicó a una columna de cromatografía alimentada por gravedad vacía y se drenó el plasma. La resina se lavó luego con 3x50 ml de HBS (HEPES 20 mM; NaCl 150 mM; pH 7.5), seguido de un lavado adicional con 2x50 ml de NaCl 4 M. El FH altamente purificado se eluyó de la columna usando solución reguladora de glicina 0.1 M, pH 2.5.

El aislamiento exitoso de FH del plasma humano se muestra en los geles de la figura 17, donde se pueden ver bandas claras de CFH para cada etapa del procedimiento de purificación anterior.

Uso de PspCN para proteger superficies

Con referencia a la figura 18, se inmovilizó PspCN etiquetada con cisteína en placas de 96 pocillos de poliestireno activado con maleimida (Pierce) según las instrucciones del fabricante usando diferentes concentraciones de Cys-PspCN en la solución reguladora de acoplamiento como se muestra. Los pocillos se incubaron posteriormente con suero humano normal fresco a temperatura ambiente para permitir que se produzca la deposición del complemento. La deposición de C3b a la superficie se detectó usando un anticuerpo anti C3 en un método análogo a un protocolo ELISA convencional. La C3b depositada se midió en función de la concentración de PspCN en la solución reguladora de acoplamiento. Tanto para PspCN etiquetada con cisteína N-terminal como C-terminal, la deposición de C3b se redujo en aproximadamente un 50% en superficies que habían sido recubiertas con 100 μg/ml de PspCN.

De acuerdo con lo anterior, la presencia de un recubrimiento de PspCN en una superficie puede reducir significativamente la deposición de C3b en esa superficie y, por lo tanto, reducir la respuesta inmunológica a esa superficie.

Uso de PspCN como diagnóstico para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-FH:

Con referencia a la figura 19, Cys-PspCN se inmovilizó en placas de 96 pocillos activadas con maleimida (Pierce) según las instrucciones del fabricante usando una concentración de PspCN en la solución reguladora de acoplamiento de 50 ug/ml. Las placas se incubaron posteriormente con factor H humano purificado, antes de incubarse con IgG purificada derivada de un paciente que se sabe que es positivo para autoanticuerpos anti-FH o un control normal. Posteriormente, se detectaron autoanticuerpos anti-FH usando un anticuerpo específico anti-IgG humano conjugado con biotina, seguido de estreptavidina peroxidasa en una forma análoga a un ELISA estándar. Los pocillos se lavaron tres veces con solución salina regulada con fosfato entre las incubaciones posteriores.

Cepa TIGR4

Se demostró que los fragmentos de la proteína PspC de la cepa TIGR4 de Streptococcus pneumonia, denominada aquí como TIGR4 PspC, se unían fuertemente a CFH. TIGR4 PspC (37-179) se une a CFH con una K_D de 10^{-16} M y TIGR4 PspC (68-148) se une a CFH con una K_D de 10^{-15} M.

Capacidad de PspCN (CbpN) a partir de la cepa de *S. pneumoniae*TIGR4 para unirse y activar CFH

Con referencia a la figura 20, PspCN de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* se acopló a un chip Biacore NTA de una manera idéntica a la usada para probar PspCN de la cepa D39. Se adquirieron sensorgramas que muestran la unión a un fragmento de PspCN de la cepa TIGR4 que comprende ya sea los residuos 37-179 o los residuos 68-148. En

cada caso, la unión de FH a las secuencias de PspCN derivadas de TIGR4 dio como resultado una unión fuerte de manera similar a la observada para la cepa D39 con KD en el intervalo de 10^{-16} M calculado en cada caso.

Con referencia a la figura 21, se realizaron ensayos de aceleración del deterioro basados en Biacore para probar el efecto sobre la actividad de aceleración delo deterioro de PspCN (TIGR4) que se une a FH de una manera idéntica a la usada para probar los fragmentos de PspCN derivados de la cepa D39. En el caso de PspCN (residuos TIGR4 37-179) y PspCN (residuos TIGR4 68-148), la unión del fragmento PspCN a FH provocó un aumento en la capacidad de FH de acelerar el deterioro de la convertasa C3 (C3bBb). Los fragmentos de PspCN solos no mostraron actividad intrínseca de aceleración del deterioro.

Con referencia a la figura 22 y la tabla 3, se realizaron ensayos de unión basados en Biacore para probar el efecto que la unión de PspCN (TIGR4) a FH tenía sobre la afinidad de FH por C3b y C3d de una manera idéntica a la usada para probar los fragmentos de PspCN derivados de D39. En cada caso, la unión de PspCN (residuos TIGR4 37-179) o PspCN (residuos TIGR4 68-148) a CFH causó un aumento significativo en la unión a C3b y un gran aumento en la afinidad de unión a CF3 por lo demás indetectable de CFH.

Tabla 3

Construcción	*C3b*			*C3d*		
	K_D/M	SE(K_D)	Chi^2/RU^2	K_D/M	SE(K_D)	Chi^2/RU^2
CFH	5.5e-7	7.8 e-8	0.35	N/A	N/A	N/A
CFH:TIGR4 (37-179)	2.8e-7	3.3e-8	1.15	1.2e-6	8.4e-8	0.10

Referencias para el ejemplo 2:

- Brooks-Walter et al. (1999) Infect Immun. 1999 December; 67(12): 6533-6542.

- Ezzell, JL et al. (1991) Blood 77:2764-2773

Secuencias Relevantes

Secuencia de gen D39 - CDS completo (SEQ ID NO 3)

```
  1 atgcttgtca ataatcacaa atatgtagat catatcttgt ttaggacagt aaaacatcct
 61 aattactttt taaatattct tcctgagttg attggcttga ccttgttgag tcatgcttat
```

```
 121 gtgacttttg ttttagtttt tccagtttat gcagttattt tgtatcgacg aatagctgaa
 181 gaggaaaagc tattacatga agttataatc ccaaatggaa gcataaagag ataaatacaa
 241 aattcgattt atatacagtt catattgaag taatatagta aggttaaaga aaaaatatag
 301 aaggaaataa acatgtttgc atcaaaaagc gaaagaaaag tacattattc aattcgtaaa
 361 tttagtattg gagtagctag tgtagctgtt gccagtcttg ttatgggaag tgtggttcat
 421 gcgacagaga acgagggaag tacccaagca gccacttctt ctaatatggc aaagacagaa
 481 cataggaaag ctgctaaaca agtcgtcgat gaatatatag aaaaaatgtt gagggagatt
 541 caactagata gaagaaaaca tacccaaaat gtcgccttaa acataaagtt gagcgcaatt
 601 aaaacgaagt atttgcgtga attaaatgtt ttagaagaga agtcgaaaga tgagttgccg
 661 tcagaaataa aagcaaagtt agacgcagct tttgagaagt ttaaaaaaga tacattgaaa
 721 ccaggagaaa aggtagcaga agctaagaag aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag
 781 gatcaaaaag aagaagatcg tcgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt
 841 gaaattgctg agttcgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa
 901 gctaaagaat ctcgaaacga gggcacaatt aagcaagcaa aagagaaagt tgagagtaaa
 961 aaagctgagg ctacaaggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa
1021 gctaaacgaa aagcagatgg taagttgaag gaagctaatg tagcgacttc agatcaaggt
1081 aaaccaaagg ggcgggcaaa acgaggagtt cctggagagc tagcaacacc tgataaaaaa
1141 gaaaatgatg cgaagtcttc agattctagc gtaggtgaag aaactcttcc aagctcatcc
1201 ctgaaatcag gaaaaaaggt agcagaagct gagaagaagg ttgaagaagc tgagaaaaaa
1261 gccaaggatc aaaaagaaga agatcgccgt aactacccaa ccaatactta caaaacgctt
1321 gaccttgaaa ttgctgagtc cgatgtgaaa gttaaagaag cggagcttga actagtaaaa
1381 gaggaagcta aggaacctcg agacgaggaa aaaattaagc aagcaaaagc gaaagttgag
1441 agtaaaaaag ctgaggctac aaggttagaa aacatcaaga cagatcgtaa aaaagcagaa
1501 gaagaagcta aacgaaaagc agcagaagaa gataaagtta aagaaaaacc agctgaacaa
1561 ccacaaccag cgccggctac tcaaccagaa aaaccagctc caaaaccaga gaagccagct
1621 gaacaaccaa aagcagaaaa aacagatgat caacaagctg aagaagacta tgctcgtaga
1681 tcagaagaag aatataatcg cttgactcaa cagcaaccgc caaaaactga aaaaccagca
1741 caaccatcta ctccaaaaac aggctggaaa caagaaaacg gtatgtggta cttctacaat
1801 actgatggtt caatggcaac aggatggctc caaaacaacg gttcatggta ctatctaaac
1861 gctaatggtg ctatggcgac aggatggctc caaaacaatg gttcatggta ctatctaaac
1921 gctaatggtt caatggcaac aggatggctc caaaacaatg gttcatggta ctacctaaac
1981 gctaatggtg ctatggcgac aggatggctc caatacaatg gttcatggta ctacctaaac
2041 agcaatggcg ctatggcgac aggatggctc caatacaatg gctcatggta ctacctcaac
2101 gctaatggtg atatggcgac aggatggctc caaaacaacg gttcatggta ctacctcaac
2161 gctaatggtg atatggcgac aggatggctc caatacaacg gttcatggta ttacctcaac
2221 gctaatggtg atatggcgac aggttgggtg aaagatggan atacctggta ctatcttaaa
2281 gcatcaggtg ctatgaaagc aagccaatgg ttcaaagtat cagataaatg gtactatgtc
2341 aatggctcag gtgcccttgc agtcaacaca actgtagatg gctatggagt caatgccaat
2401 ggtgaatggg taaactaaac ctaatataac tagttaatac tgacttcctg taagaacttt
2461 ttaaagtatt ccctacaaat accatatcct ttcagtagat aatataccct tgtaggaagt
2521 ttagattaaa aaataactct gtaatctcta gccggattta tagcgctaga gactacggag
2581 ttttttttgat gaggaaagaa tggcggcatt caagagactc tttaagagag ttacgggttt
2641 taaactatta agccttctcc aattgcaaga gggcttcaat ctctgctagg gtgctagctt
2701 gcgaaatggc tccacggagt ttngc
```

Secuencia de aminoácidos transcrita de SEQ ID NO 3 (SEQ ID NO 4) – la secuencia PspCN (37 a 140 aminoácidos) se muestra en negrilla:

MFASKSERKVHYSIRKFSIGVASVAVASLVMGSVVH**ATENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEY**
IEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLK
PGEKVAEAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVKEEAKESRNEG
TIKQAKEKVESKKAEATRLENIKTDRKKAEEEAKRKADGKLKEANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELAT
PDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLKSGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDLEI
AESDVKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAEATRLENIKTDRKKAEEEAKRKAAEEDK
VKEKPAEQPQPAPATQPEKPAPKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKTEKPA
QPSTPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATG
WLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWLQNNGSW
YYLNANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWVKDGXTWYYLKASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGSG
ALAVNTTVDGYGVNANGEWVN

La secuencia de ADN optimizada de codón, sintética que se usó para la expresión de PspCN se muestra a continuación (SEQ ID NO 5):

GCAACCGAAAATGAAGGTAGCACCCAGGCAGCAACCAGCAGCAATATGGCAAAAACCGAACATCGTAA
AGCAGCCAAACAGGTTGTGGATGAGTATATCGAAAAAATGCTGCGTGAAATTCAGCTGGATCGTCGTA
AACATACCCAGAATGTTGCACTGAACATTAAACTGAGCGCCATCAAAACCAAATATCTGCGTGAACTG
AATGTGCTGGAAGAGAAAAGCAAAGATGAACTGCCGAGCGAAATTAAAGCAAAACTGGATGCAGCCTT
TGAAAAATTCAAAAAAGATACCCTGAAACCGGGTGAGAAATAA

Secuencia de aminoácidos CFH humana – péptido señal subrayado - forma no procesada (SEQ ID NO 6):

```
        10         20         30         40         50         60
MRLLAKIICL MLWAICVAED CNELPPRRNT EILTGSWSDQ TYPEGTQAIY KCRPGYRSLG

        70         80         90        100        110        120
NVIMVCRKGE WVALNPLRKC QKRPCGHPGD TPFGTFTLTG GNVFEYGVKA VYTCNEGYQL

       130        140        150        160        170        180
LGEINYRECD TDGWTNDIPI CEVVKCLPVT APENGKIVSS AMEPDREYHF GQAVRFVCNS

       190        200        210        220        230        240
GYKIEGDEEM HCSDDGFWSK EKPKCVEISC KSPDVINGSP ISQKIIYKEN ERFQYKCNMG

       250        260        270        280        290        300
YEYSERGDAV CTESGWRPLP SCEEKSCDNP YIPNGDYSPL RIKHRTGDEI TYQCRNGFYP

       310        320        330        340        350        360
ATRGNTAKCT STGWIPAPRC TLKPCDYPDI KHGGLYHENM RRPYFPVAVG KYYSYYCDEH

       370        380        390        400        410        420
FETPSGSYWD HIHCTQDGWS PAVPCLRKCY FPYLENGYNQ NYGRKFVQGK SIDVACHPGY
```

```
       430        440        450        460        470        480
ALPKAQTTVT CMENGWSPTP RCIRVKTCSK SSIDIENGFI SESQYTYALK EKAKYQCKLG

       490        500        510        520        530        540
YVTADGETSG SITCGKDGWS AQPTCIKSCD IPVFMNARTK NDFTWFKLND TLDYECHDGY

       550        560        570        580        590        600
ESNTGSTTGS IVCGYNGWSD LPICYERECE LPKIDVHLVP DRKKDQYKVG EVLKFSCKPG

       610        620        630        640        650        660
FTIVGPNSVQ CYHFGLSPDL PICKEQVQSC GPPPELLNGN VKEKTKEEYG HSEVVEYYCN

       670        680        690        700        710        720
PRFLMKGPNK IQCVDGEWTT LPVCIVEEST CGDIPELEHG WAQLSSPPYY YGDSVEFNCS

       730        740        750        760        770        780
ESFTMIGHRS ITCIHGVWTQ LPQCVAIDKL KKCKSSNLII LEEHLKNKKE FDHNSNIRYR

       790        800        810        820        830        840
CRGKEGWIHT VCINGRWDPE VNCSMAQIQL CPPPPQIPNS HNMTTTLNYR DGEKVSVLCQ

       850        860        870        880        890        900
ENYLIQEGEE ITCKDGRWQS IPLCVEKIPC SQPPQIEHGT INSSRSSQES YAHGTKLSYT

       910        920        930        940        950        960
CEGGFRISEE NETTCYMGKW SSPPQCEGLP CKSPPEISHG VVAHMSDSYQ YGEEVTYKCF

       970        980        990       1000       1010       1020
EGFGIDGPAI AKCLGEKWSH PPSCIKTDCL SLPSFENAIP MGEKKDVYKA GEQVTYTCAT

      1030       1040       1050       1060       1070       1080
YYKMDGASNV TCINSRWTGR PTCRDTSCVN PPTVQNAYIV SRQMSKYPSG ERVRYQCRSP

      1090       1100       1110       1120       1130       1140
YEMFGDEEVM CLNGNWTEPP QCKDSTGKCG PPPPIDNGDI TSFPLSVYAP ASSVEYQCQN

      1150       1160       1170       1180       1190       1200
LYQLEGNKRI TCRNGQWSEP PKCLHPCVIS REIMENYNIA LRWTAKQKLY SRTGESVEFV

      1210       1220       1230
CKRGYRLSSR SHTLRTTCWD GKLEYPTCAK R
```

Listado de secuencias

<110> The University Court of the University of Edinburgh

<120> Proteínas con usos de diagnóstico y terapéutico

<130> P209986WO

<150> GB 1318170.6

<151> 2013-10-14

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 104

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

```
Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met
1               5                  10                  15

Ala Lys Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr
            20                  25                  30

Ile Glu Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr
        35                  40                  45

Gln Asn Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr
    50                  55                  60

Leu Arg Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro
65                  70                  75                  80

Ser Glu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys
                85                  90                  95

Asp Thr Leu Lys Pro Gly Glu Lys
            100
```

<210> 2

<211> 79

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

```
Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln
1               5                  10                  15

Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu
            20                  25                  30

Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala
    50                  55                  60

Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Pro Gly Glu Lys
65                  70                  75
```

<210> 3

<211> 2725

<212> ADN

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> característica_misc

<222> (2260)..(2260)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (2723)..(2723)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 3

atgcttgtca ataatcacaa atatgtagat catatcttgt ttaggacagt aaaacatcct 60

aattactttt taaatattct tcctgagttg attggcttga ccttgttgag tcatgcttat 120

gtgacttttg ttttagtttt tccagtttat gcagttattt tgtatcgacg aatagctgaa 180

gaggaaaagc tattacatga agttataatc ccaaatggaa gcataaagag ataaatacaa 240

aattcgattt atatacagtt catattgaag taatatagta aggttaaaga aaaaatatag 300

aaggaaataa acatgtttgc atcaaaaagc gaaagaaaag tacattattc aattcgtaaa 360

tttagtattg gagtagctag tgtagctgtt gccagtcttg ttatgggaag tgtggttcat 420

gcgacagaga acgagggaag tacccaagca gccacttctt ctaatatggc aaagacagaa 480

cataggaaag ctgctaaaca agtcgtcgat gaatatatag aaaaaatgtt gagggagatt 540

caactagata gaagaaaaca tacccaaaat gtcgccttaa acataaagtt gagcgcaatt 600

aaaacgaagt atttgcgtga attaaatgtt ttagaagaga agtcgaaaga tgagttgccg 660

tcagaaataa aagcaaagtt agacgcagct tttgagaagt ttaaaaaaga tacattgaaa 720

ccaggagaaa aggtagcaga agctaagaag aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag 780

gatcaaaaag aagaagatcg tcgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt 840

gaaattgctg agttcgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 900

gctaaagaat ctcgaaacga gggcacaatt aagcaagcaa aagagaaagt tgagagtaaa 960

aaagctgagg ctacaaggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1020

gctaaacgaa aagcagatgg taagttgaag gaagctaatg tagcgacttc agatcaaggt 1080

aaaccaaagg ggcgggcaaa acgaggagtt cctggagagc tagcaacacc tgataaaaaa 1140

gaaaatgatg cgaagtcttc agattctagc gtaggtgaag aaactcttcc aagctcatcc 1200

ctgaaatcag gaaaaaaggt agcagaagct gagaagaagg ttgaagaagc tgagaaaaaa 1260

gccaaggatc aaaaagaaga agatcgccgt aactacccaa ccaatactta caaaacgctt 1320

gaccttgaaa ttgctgagtc cgatgtgaaa gttaaagaag cggagcttga actagtaaaa 1380

gaggaagcta aggaacctcg agacgaggaa aaaattaagc aagcaaaagc gaaagttgag 1440

agtaaaaaag ctgaggctac aaggttagaa aacatcaaga cagatcgtaa aaaagcagaa 1500

gaagaagcta aacgaaaagc agcagaagaa gataaagtta aagaaaaacc agctgaacaa 1560

ccacaaccag cgccggctac tcaaccagaa aaaccagctc caaaaccaga gaagccagct 1620

gaacaaccaa aagcagaaaa aacagatgat caacaagctg aagaagacta tgctcgtaga 1680

tcagaagaag aatataatcg cttgactcaa cagcaaccgc caaaaactga aaaaccagca 1740

caaccatcta ctccaaaaac aggctggaaa caagaaaacg gtatgtggta cttctacaat 1800

actgatggtt caatggcaac aggatggctc caaaacaacg gttcatggta ctatctaaac 1860

gctaatggtg ctatggcgac aggatggctc caaaacaatg gttcatggta ctatctaaac 1920

gctaatggtt caatggcaac aggatggctc caaaacaatg gttcatggta ctacctaaac 1980

gctaatggtg ctatggcgac aggatggctc caatacaatg gttcatggta ctacctaaac 2040

agcaatggcg ctatggcgac aggatggctc caatacaatg gctcatggta ctacctcaac 2100

gctaatggtg atatggcgac aggatggctc caaaacaacg gttcatggta ctacctcaac 2160

gctaatggtg atatggcgac aggatggctc caatacaacg gttcatggta ttacctcaac 2220

gctaatggtg atatggcgac aggttgggtg aaagatggan atacctggta ctatcttaaa 2280

gcatcaggtg ctatgaaagc aagccaatgg ttcaaagtat cagataaatg gtactatgtc 2340

aatggctcag gtgcccttgc agtcaacaca actgtagatg gctatggagt caatgccaat 2400

ggtgaatggg taaactaaac ctaatataac tagttaatac tgacttcctg taagaacttt 2460

ttaaagtatt ccctacaaat accatatcct ttcagtagat aatataccct tgtaggaagt 2520

ttagattaaa aaataactct gtaatctcta gccggattta tagcgctaga gactacggag 2580

ttttttttgat gaggaaagaa tggcggcatt caagagactc tttaagagag ttacgggttt 2640

taaactatta agccttctcc aattgcaaga gggcttcaat ctctgctagg gtgctagctt 2700

gcgaaatggc tccacggagt ttngc 2725

<210> 4

<211> 701

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> característica_misc

<222> (650)..(650)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

```
Met Phe Ala Ser Lys Ser Glu Arg Lys Val His Tyr Ser Ile Arg Lys
1               5                   10                  15

Phe Ser Ile Gly Val Ala Ser Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly
            20                  25                  30

Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr
        35                  40                  45

Ser Ser Asn Met Ala Lys Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val
    50                  55                  60

Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg
65                  70                  75                  80

Arg Lys His Thr Gln Asn Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile
                85                  90                  95

Lys Thr Lys Tyr Leu Arg Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys
            100                 105                 110

Asp Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu
        115                 120                 125

Lys Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu
145                 150                 155                 160

Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu
                165                 170                 175

Glu Ile Ala Glu Phe Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu
            180                 185                 190

Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln
        195                 200                 205
```

```
Ala Lys Glu Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu
    210                 215                 220

Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys
225                 230                 235                 240

Ala Asp Gly Lys Leu Lys Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly
                245                 250                 255

Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr
            260                 265                 270

Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly
        275                 280                 285

Glu Glu Thr Leu Pro Ser Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala
    290                 295                 300

Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln
305                 310                 315                 320

Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu
                325                 330                 335

Asp Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu
            340                 345                 350

Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile
        355                 360                 365

Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg
    370                 375                 380

Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys
385                 390                 395                 400

Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln
                405                 410                 415

Pro Gln Pro Ala Pro Ala Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro
            420                 425                 430

Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln
        435                 440                 445

Ala Glu Glu Asp Tyr Ala Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu
    450                 455                 460
```

```
Thr Gln Gln Gln Pro Pro Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr
465                 470                 475                 480

Pro Lys Thr Gly Trp Lys Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn
                485                 490                 495

Thr Asp Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp
            500                 505                 510

Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn
        515                 520                 525

Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly
    530                 535                 540

Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala
545                 550                 555                 560

Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn
                565                 570                 575

Ser Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp
            580                 585                 590

Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn
        595                 600                 605

Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly
    610                 615                 620

Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp
625                 630                 635                 640

Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Xaa Thr Trp Tyr Tyr Leu Lys
                645                 650                 655

Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys
            660                 665                 670

Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val
        675                 680                 685

Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
    690                 695                 700
```

<210> 5

<211> 315

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN optimizada con codón usada para expresar PspCN

<400> 5

```
gcaaccgaaa atgaaggtag cacccaggca gcaaccagca gcaatatggc aaaaaccgaa      60

catcgtaaag cagccaaaca ggttgtggat gagtatatcg aaaaaatgct gcgtgaaatt     120

cagctggatc gtcgtaaaca tacccagaat gttgcactga acattaaact gagcgccatc     180

aaaaccaaat atctgcgtga actgaatgtg ctggaagaga aaagcaaaga tgaactgccg     240

agcgaaatta aagcaaaact ggatgcagcc tttgaaaaat tcaaaaaaga taccctgaaa     300

ccgggtgaga aataa                                                      315
```

<210> 6

<211> 1231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Arg Leu Leu Ala Lys Ile Ile Cys Leu Met Leu Trp Ala Ile Cys
1               5                  10                  15

Val Ala Glu Asp Cys Asn Glu Leu Pro Pro Arg Arg Asn Thr Glu Ile
            20                  25                  30

Leu Thr Gly Ser Trp Ser Asp Gln Thr Tyr Pro Glu Gly Thr Gln Ala
        35                  40                  45

Ile Tyr Lys Cys Arg Pro Gly Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Val Ile Met
    50                  55                  60

Val Cys Arg Lys Gly Glu Trp Val Ala Leu Asn Pro Leu Arg Lys Cys
65                  70                  75                  80

Gln Lys Arg Pro Cys Gly His Pro Gly Asp Thr Pro Phe Gly Thr Phe
                85                  90                  95

Thr Leu Thr Gly Gly Asn Val Phe Glu Tyr Gly Val Lys Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Thr Cys Asn Glu Gly Tyr Gln Leu Leu Gly Glu Ile Asn Tyr Arg Glu
        115                 120                 125

Cys Asp Thr Asp Gly Trp Thr Asn Asp Ile Pro Ile Cys Glu Val Val
    130                 135                 140
```

```
Lys Cys Leu Pro Val Thr Ala Pro Glu Asn Gly Lys Ile Val Ser Ser
145                 150                 155                 160

Ala Met Glu Pro Asp Arg Glu Tyr His Phe Gly Gln Ala Val Arg Phe
                165                 170                 175

Val Cys Asn Ser Gly Tyr Lys Ile Glu Gly Asp Glu Glu Met His Cys
            180                 185                 190

Ser Asp Asp Gly Phe Trp Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Val Glu Ile
        195                 200                 205

Ser Cys Lys Ser Pro Asp Val Ile Asn Gly Ser Pro Ile Ser Gln Lys
    210                 215                 220

Ile Ile Tyr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Gln Tyr Lys Cys Asn Met Gly
225                 230                 235                 240

Tyr Glu Tyr Ser Glu Arg Gly Asp Ala Val Cys Thr Glu Ser Gly Trp
                245                 250                 255

Arg Pro Leu Pro Ser Cys Glu Glu Lys Ser Cys Asp Asn Pro Tyr Ile
            260                 265                 270

Pro Asn Gly Asp Tyr Ser Pro Leu Arg Ile Lys His Arg Thr Gly Asp
        275                 280                 285

Glu Ile Thr Tyr Gln Cys Arg Asn Gly Phe Tyr Pro Ala Thr Arg Gly
    290                 295                 300

Asn Thr Ala Lys Cys Thr Ser Thr Gly Trp Ile Pro Ala Pro Arg Cys
305                 310                 315                 320

Thr Leu Lys Pro Cys Asp Tyr Pro Asp Ile Lys His Gly Gly Leu Tyr
                325                 330                 335

His Glu Asn Met Arg Arg Pro Tyr Phe Pro Val Ala Val Gly Lys Tyr
            340                 345                 350

Tyr Ser Tyr Tyr Cys Asp Glu His Phe Glu Thr Pro Ser Gly Ser Tyr
        355                 360                 365

Trp Asp His Ile His Cys Thr Gln Asp Gly Trp Ser Pro Ala Val Pro
    370                 375                 380

Cys Leu Arg Lys Cys Tyr Phe Pro Tyr Leu Glu Asn Gly Tyr Asn Gln
385                 390                 395                 400
```

```
Asn Tyr Gly Arg Lys Phe Val Gln Gly Lys Ser Ile Asp Val Ala Cys
                405                 410                 415

His Pro Gly Tyr Ala Leu Pro Lys Ala Gln Thr Thr Val Thr Cys Met
            420                 425                 430

Glu Asn Gly Trp Ser Pro Thr Pro Arg Cys Ile Arg Val Lys Thr Cys
        435                 440                 445

Ser Lys Ser Ser Ile Asp Ile Glu Asn Gly Phe Ile Ser Glu Ser Gln
    450                 455                 460

Tyr Thr Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Ala Lys Tyr Gln Cys Lys Leu Gly
465                 470                 475                 480

Tyr Val Thr Ala Asp Gly Glu Thr Ser Gly Ser Ile Thr Cys Gly Lys
                485                 490                 495

Asp Gly Trp Ser Ala Gln Pro Thr Cys Ile Lys Ser Cys Asp Ile Pro
            500                 505                 510

Val Phe Met Asn Ala Arg Thr Lys Asn Asp Phe Thr Trp Phe Lys Leu
        515                 520                 525

Asn Asp Thr Leu Asp Tyr Glu Cys His Asp Gly Tyr Glu Ser Asn Thr
    530                 535                 540

Gly Ser Thr Thr Gly Ser Ile Val Cys Gly Tyr Asn Gly Trp Ser Asp
545                 550                 555                 560

Leu Pro Ile Cys Tyr Glu Arg Glu Cys Glu Leu Pro Lys Ile Asp Val
                565                 570                 575

His Leu Val Pro Asp Arg Lys Lys Asp Gln Tyr Lys Val Gly Glu Val
            580                 585                 590

Leu Lys Phe Ser Cys Lys Pro Gly Phe Thr Ile Val Gly Pro Asn Ser
        595                 600                 605

Val Gln Cys Tyr His Phe Gly Leu Ser Pro Asp Leu Pro Ile Cys Lys
    610                 615                 620

Glu Gln Val Gln Ser Cys Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Asn Gly Asn
625                 630                 635                 640

Val Lys Glu Lys Thr Lys Glu Glu Tyr Gly His Ser Glu Val Val Glu
                645                 650                 655
```

```
Tyr Tyr Cys Asn Pro Arg Phe Leu Met Lys Gly Pro Asn Lys Ile Gln
            660                 665                 670

Cys Val Asp Gly Glu Trp Thr Thr Leu Pro Val Cys Ile Val Glu Glu
        675                 680                 685

Ser Thr Cys Gly Asp Ile Pro Glu Leu Glu His Gly Trp Ala Gln Leu
    690                 695                 700

Ser Ser Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Glu Phe Asn Cys Ser
705                 710                 715                 720

Glu Ser Phe Thr Met Ile Gly His Arg Ser Ile Thr Cys Ile His Gly
                725                 730                 735

Val Trp Thr Gln Leu Pro Gln Cys Val Ala Ile Asp Lys Leu Lys Lys
            740                 745                 750

Cys Lys Ser Ser Asn Leu Ile Ile Leu Glu Glu His Leu Lys Asn Lys
        755                 760                 765

Lys Glu Phe Asp His Asn Ser Asn Ile Arg Tyr Arg Cys Arg Gly Lys
    770                 775                 780

Glu Gly Trp Ile His Thr Val Cys Ile Asn Gly Arg Trp Asp Pro Glu
785                 790                 795                 800

Val Asn Cys Ser Met Ala Gln Ile Gln Leu Cys Pro Pro Pro Pro Gln
                805                 810                 815

Ile Pro Asn Ser His Asn Met Thr Thr Thr Leu Asn Tyr Arg Asp Gly
            820                 825                 830

Glu Lys Val Ser Val Leu Cys Gln Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Glu Gly
        835                 840                 845

Glu Glu Ile Thr Cys Lys Asp Gly Arg Trp Gln Ser Ile Pro Leu Cys
    850                 855                 860

Val Glu Lys Ile Pro Cys Ser Gln Pro Pro Gln Ile Glu His Gly Thr
865                 870                 875                 880

Ile Asn Ser Ser Arg Ser Ser Gln Glu Ser Tyr Ala His Gly Thr Lys
                885                 890                 895

Leu Ser Tyr Thr Cys Glu Gly Gly Phe Arg Ile Ser Glu Glu Asn Glu
```

```
            900                 905                 910

Thr Thr Cys Tyr Met Gly Lys Trp Ser Ser Pro Pro Gln Cys Glu Gly
        915                 920                 925

Leu Pro Cys Lys Ser Pro Pro Glu Ile Ser His Gly Val Val Ala His
    930                 935                 940

Met Ser Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Glu Glu Val Thr Tyr Lys Cys Phe
945                 950                 955                 960

Glu Gly Phe Gly Ile Asp Gly Pro Ala Ile Ala Lys Cys Leu Gly Glu
                965                 970                 975

Lys Trp Ser His Pro Pro Ser Cys Ile Lys Thr Asp Cys Leu Ser Leu
            980                 985                 990

Pro Ser Phe Glu Asn Ala Ile Pro  Met Gly Glu Lys Lys  Asp Val Tyr
        995                 1000                1005

Lys Ala  Gly Glu Gln Val Thr  Tyr Thr Cys Ala Thr  Tyr Tyr Lys
    1010                1015                1020

Met Asp  Gly Ala Ser Asn Val  Thr Cys Ile Asn Ser  Arg Trp Thr
    1025                1030                1035

Gly Arg  Pro Thr Cys Arg Asp  Thr Ser Cys Val Asn  Pro Pro Thr
    1040                1045                1050

Val Gln  Asn Ala Tyr Ile Val  Ser Arg Gln Met Ser  Lys Tyr Pro
    1055                1060                1065

Ser Gly  Glu Arg Val Arg Tyr  Gln Cys Arg Ser Pro  Tyr Glu Met
    1070                1075                1080

Phe Gly  Asp Glu Glu Val Met  Cys Leu Asn Gly Asn  Trp Thr Glu
    1085                1090                1095

Pro Pro  Gln Cys Lys Asp Ser  Thr Gly Lys Cys Gly  Pro Pro Pro
    1100                1105                1110

Pro Ile  Asp Asn Gly Asp Ile  Thr Ser Phe Pro Leu  Ser Val Tyr
    1115                1120                1125

Ala Pro  Ala Ser Ser Val Glu  Tyr Gln Cys Gln Asn  Leu Tyr Gln
    1130                1135                1140
```

```
Leu Glu  Gly Asn Lys Arg Ile  Thr Cys Arg Asn Gly  Gln Trp Ser
    1145                1150                1155

Glu Pro  Pro Lys Cys Leu His  Pro Cys Val Ile Ser  Arg Glu Ile
    1160                1165                1170

Met Glu  Asn Tyr Asn Ile Ala  Leu Arg Trp Thr Ala  Lys Gln Lys
    1175                1180                1185

Leu Tyr  Ser Arg Thr Gly Glu  Ser Val Glu Phe Val  Cys Lys Arg
    1190                1195                1200

Gly Tyr  Arg Leu Ser Ser Arg  Ser His Thr Leu Arg  Thr Thr Cys
    1205                1210                1215

Trp Asp  Gly Lys Leu Glu Tyr  Pro Thr Cys Ala Lys  Arg
    1220                1225                1230
```

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PspCN Cys modificada terminalmente en N

<400> 7

```
Cys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Glu Asn Glu
1               5                   10                  15

Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys Thr Glu His
            20                  25                  30

Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys Met Leu
        35                  40                  45

Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Ala Leu
    50                  55                  60

Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg Glu Leu Asn
65                  70                  75                  80

Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala
                85                  90                  95

Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Pro
            100                 105                 110

Gly Glu Lys

                            115
```

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PspCN Cys modificada terminalmente en C

<400> 8

```
Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met
1               5                   10                  15

Ala Lys Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr
            20                  25                  30

Ile Glu Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr
        35                  40                  45

Gln Asn Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr
    50                  55                  60

Leu Arg Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro
65                  70                  75                  80

Ser Glu Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys
                85                  90                  95

Asp Thr Leu Lys Pro Gly Glu Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
            100                 105                 110

Gly Gly Cys
        115
```

<210> 9

<211> 143

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

```
Ala Thr Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg
1               5                   10                  15

Ala Asn Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp
            20                  25                  30

Ser Glu Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys
        35                  40                  45
```

```
Ile Val Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile
    50                  55                  60

Thr Val Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Asn Lys Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met
                85                  90                  95

Met Glu Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys
            100                 105                 110

Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala
        115                 120                 125

Ser Asp Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys
    130                 135                 140
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante inmovilizada en una superficie, la proteína recombinante es capaz de unirse al factor H del complemento, e inducir así una mayor unión de C3d y C3b por el factor H del complemento unido en comparación con el CFH no unida, en el que la proteína recombinante se une al CFH dentro de las proteínas de control del complemento (CCP) 8-10 de CFH.

2. La proteína recombinante según la reivindicación 1, en la que la superficie es una superficie de una perla, recipiente, dispositivo médico, microcápsula o un tejido biológico, preferiblemente en el que la superficie es una superficie de un dispositivo médico o tejido biológico.

3. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína es capaz de unirse al factor H del complemento de tipo salvaje para formar un complejo con una K_D de 1 x 10^{-10} M o menos.

4. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según la reivindicación 3, en la que la proteína es capaz de unirse al factor H del complemento de tipo salvaje para formar un complejo con una K_D de 1 x 10^{-13} M o menos.

5. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según la reivindicación 1, en la que la proteína se deriva de PspC de la cepa D39 (NCTC no 7466) de *S. pneumoniae*, o

en la que la proteína se deriva de PspC de la cepa TIGR4 (NCTC no 7465) de *S. pneumoniae*.

6. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína comprende un fragmento de PspC, o una variante de la misma, que tiene una longitud de 70 a 150 aminoácidos.

7. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína comprende la secuencia:

ATENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKL
SAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEK (SEQ ID NO 1),

o una variante funcional o fragmento del mismo; o

KQWDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVALNIKLSAIKTKYLRELNVLEEKSKDELPSEIK AKLDAAFEKFKKDTLKPGEK (SEQ ID NO 2), o una variante funcional o fragmento del mismo.

8. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la proteína comprende la secuencia:

ATENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSERDKARKEVEEYVKKIVGESYA
KSTKKRHTITVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQLQILMMESRSKVDEAVSKFEKD SSSSSSSDSSTKPEASD-TAKPNKPTEPGEK (SEQ ID NO 9), o una variante funcional o fragmento del mismo.

9. La proteína recombinante inmovilizada en una superficie según la reivindicación 1, en la que la proteína comprende al menos los aminoácidos 68-136 de PspC, o una variante funcional de los mismos.

10. La proteína recombinante según cualquier reivindicación precedente, que está unida a CFH, en la que CFH se mantiene en una conformación o conformaciones, que es/son más activas que la conformación o conformaciones adoptadas por CFH solo.

11. Un dispositivo médico, en el que la superficie del dispositivo médico está recubierta al menos parcialmente con una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un dispositivo médico según la reivindicación 11, en el que sustancialmente todas las superficies externas del dispositivo (esto es, aquellas que estarán en contacto con tejidos y/o fluidos corporales) están recubiertas con la proteína.

13. Un dispositivo médico según la reivindicación 11 o 12, en el que el dispositivo médico es un dispositivo médico implantable o una microcápsula.

14. Un dispositivo médico según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el dispositivo está recubierto con un compuesto de la proteína como se establece en una cualquiera de la reivindicación 1 a la reivindicación 10, unido al factor H del complemento, preferiblemente en el que se mantiene el factor H del complemento en una conformación o conformaciones que es/son más activas que la conformación o conformaciones adoptadas por el factor H del complemento solo.

15. Un método de tratamiento de un dispositivo médico, el método comprende:

- proporcionar un dispositivo médico;

- proporcionar una proteína recombinante capaz de unirse al factor H del complemento, e inducir así una mayor unión de C3d y C3b por el factor H del complemento unido en comparación con CFH no unido, en la que la proteína recombinante se une a CFH dentro de las proteínas de control del complemento (CCP) 8-10 de CFH; y

- unir dicha proteína a al menos una parte de la superficie del dispositivo médico.

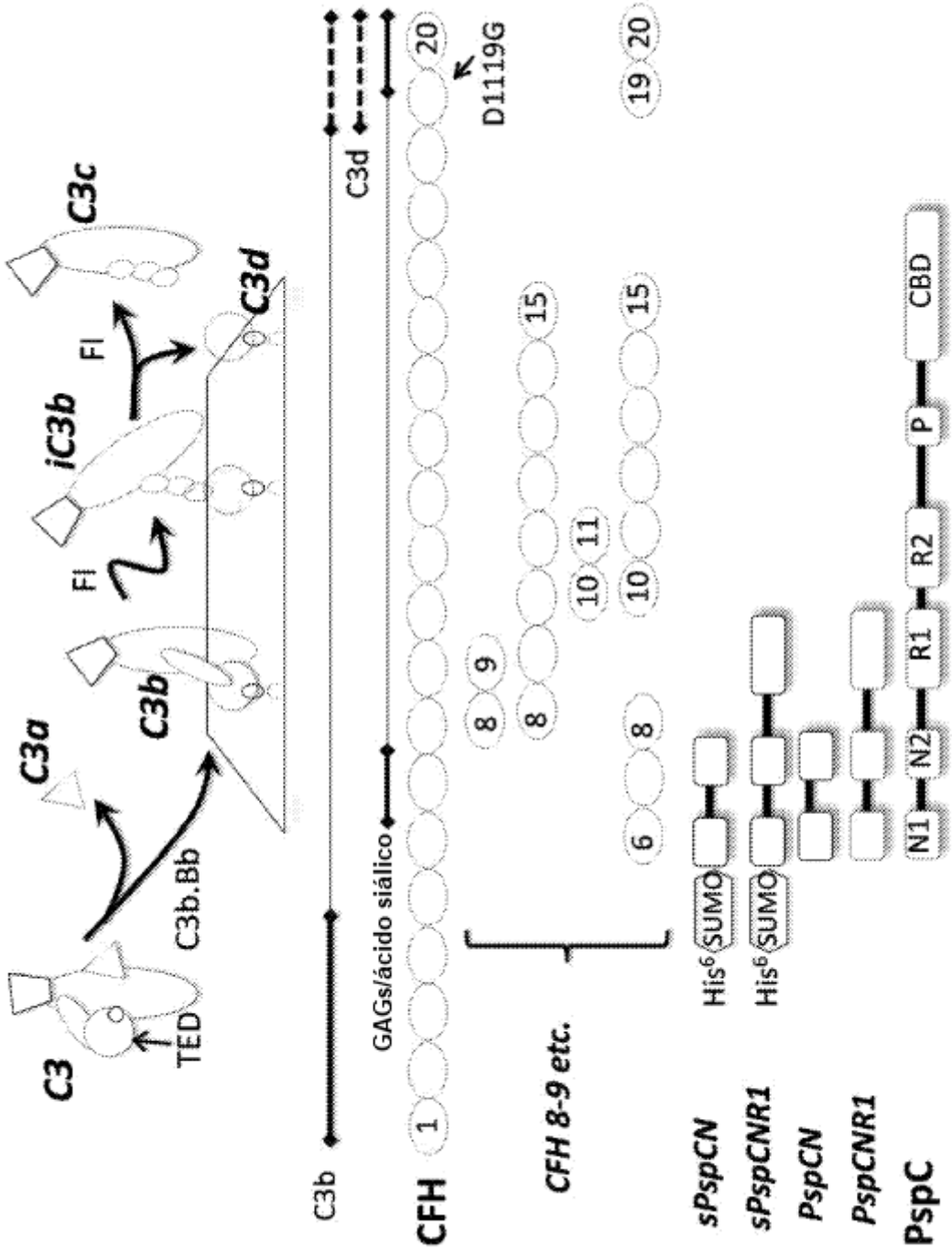

C3
TED
C3a
C3b.Bb
C3b
FI
iC3b
FI
C3c
C3d
C3b
C3d
GAGs/ácido siálico
CFH
1
8
9
8
15
10
11
10
15
6
8
10
15
19
20
D1119G
CFH 8-9 etc.
sPspCN
sPspCNR1
PspCN
PspCNR1
PspC
His6
SUMO
His6
SUMO
N1
N2
R1
R2
P
CBD

Fig 1

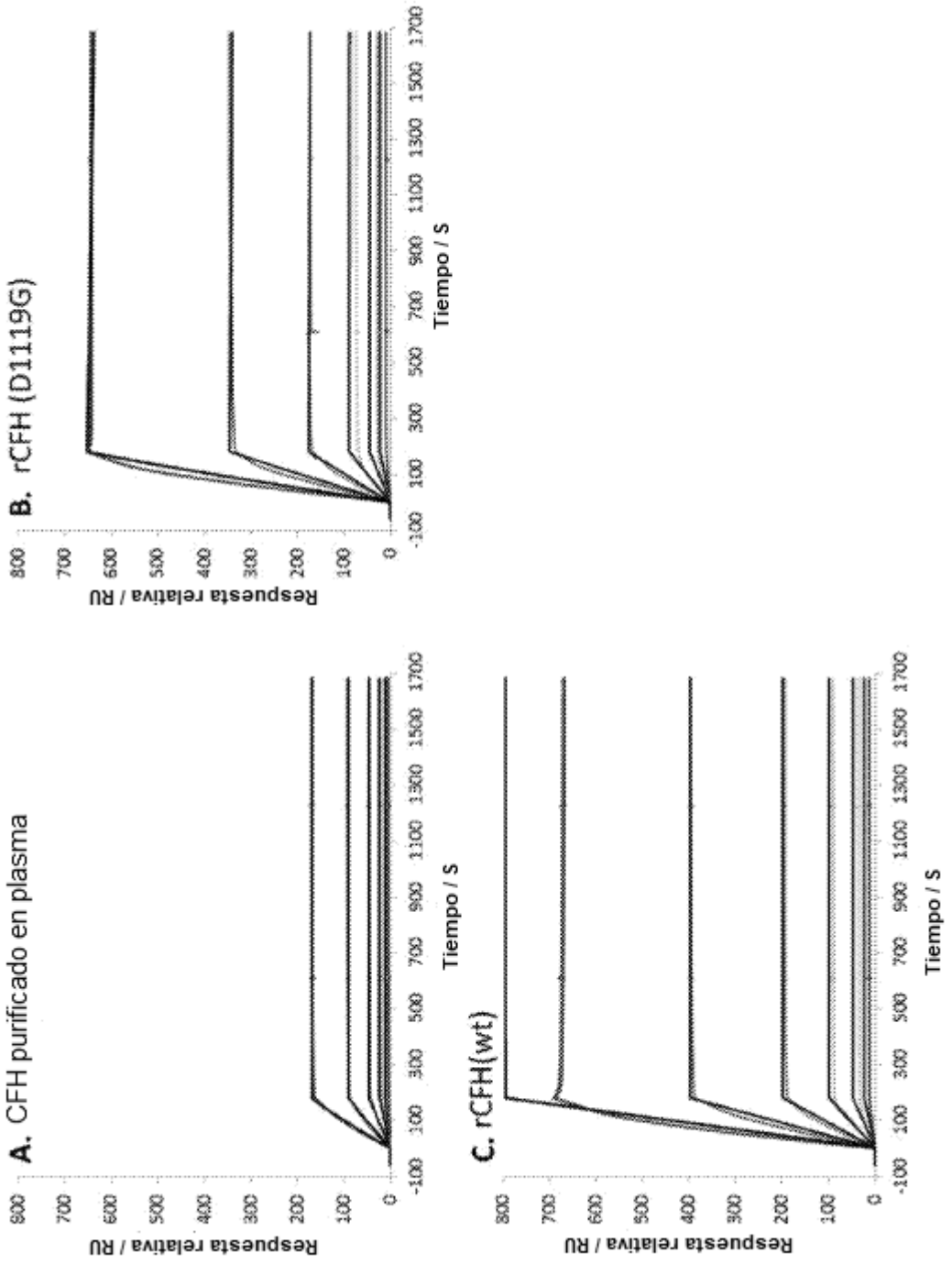

A. CFH purificado en plasma
B. rCFH (D1119G)
C. rCFH(wt)
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S

Fig 2

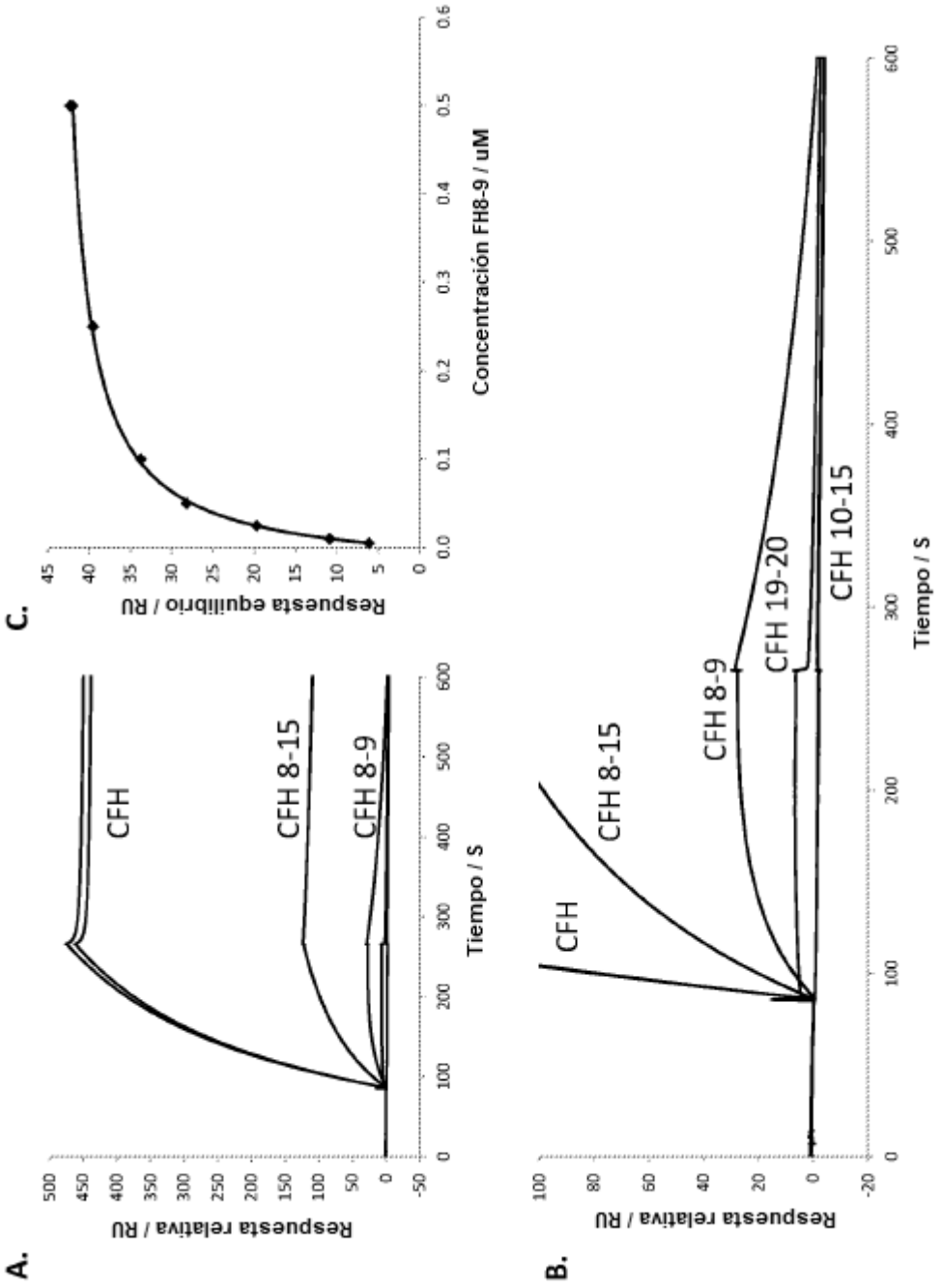

A.
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
CFH
CFH 8-15
CFH 8-9
B.
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
CFH
CFH 8-15
CFH 8-9
CFH 19-20
CFH 10-15
C.
Respuesta equilibrio / RU
Concentración FH8-9 / uM

Fig 3

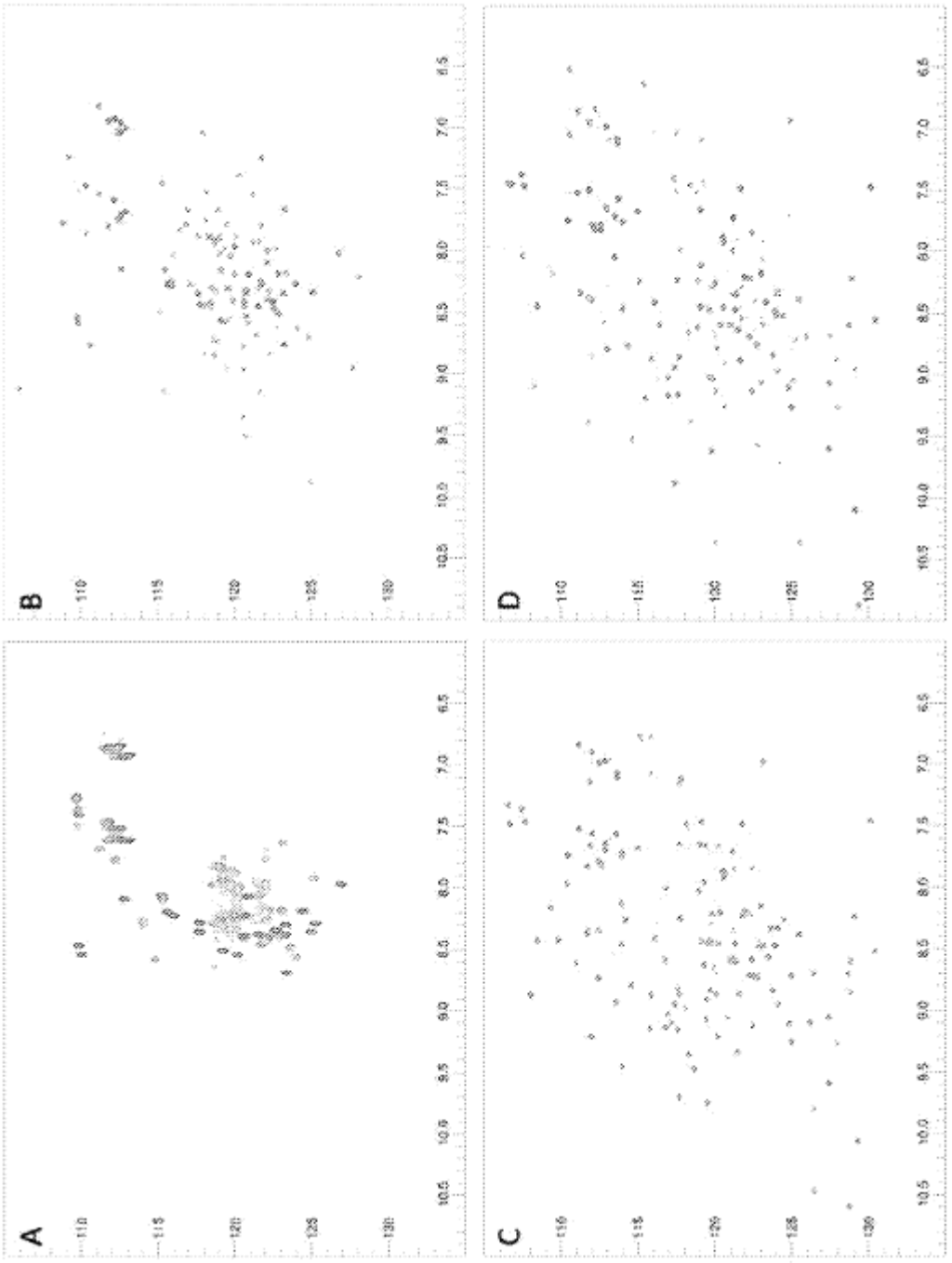


Fig 4

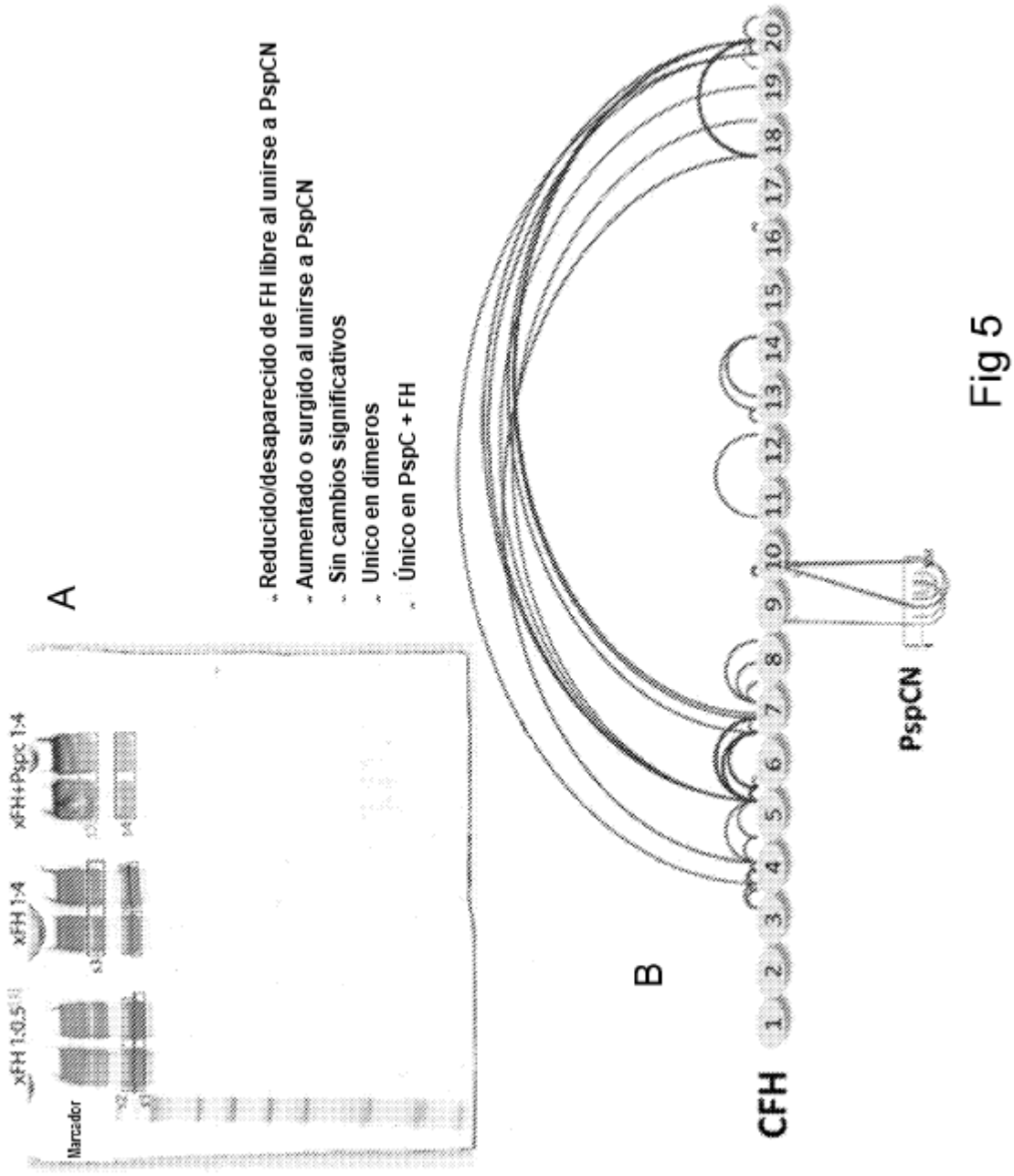

A
Marcador
xFH 1:0,5
xFH 1:4
xFH+PspC 1:4
Reducido/desaparecido de FH libre al unirse a PspCN
Aumentado o surgido al unirse a PspCN
Sin cambios significativos
Unico en dimeros
Único en PspC + FH
B
CFH
PspCN
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Fig 5

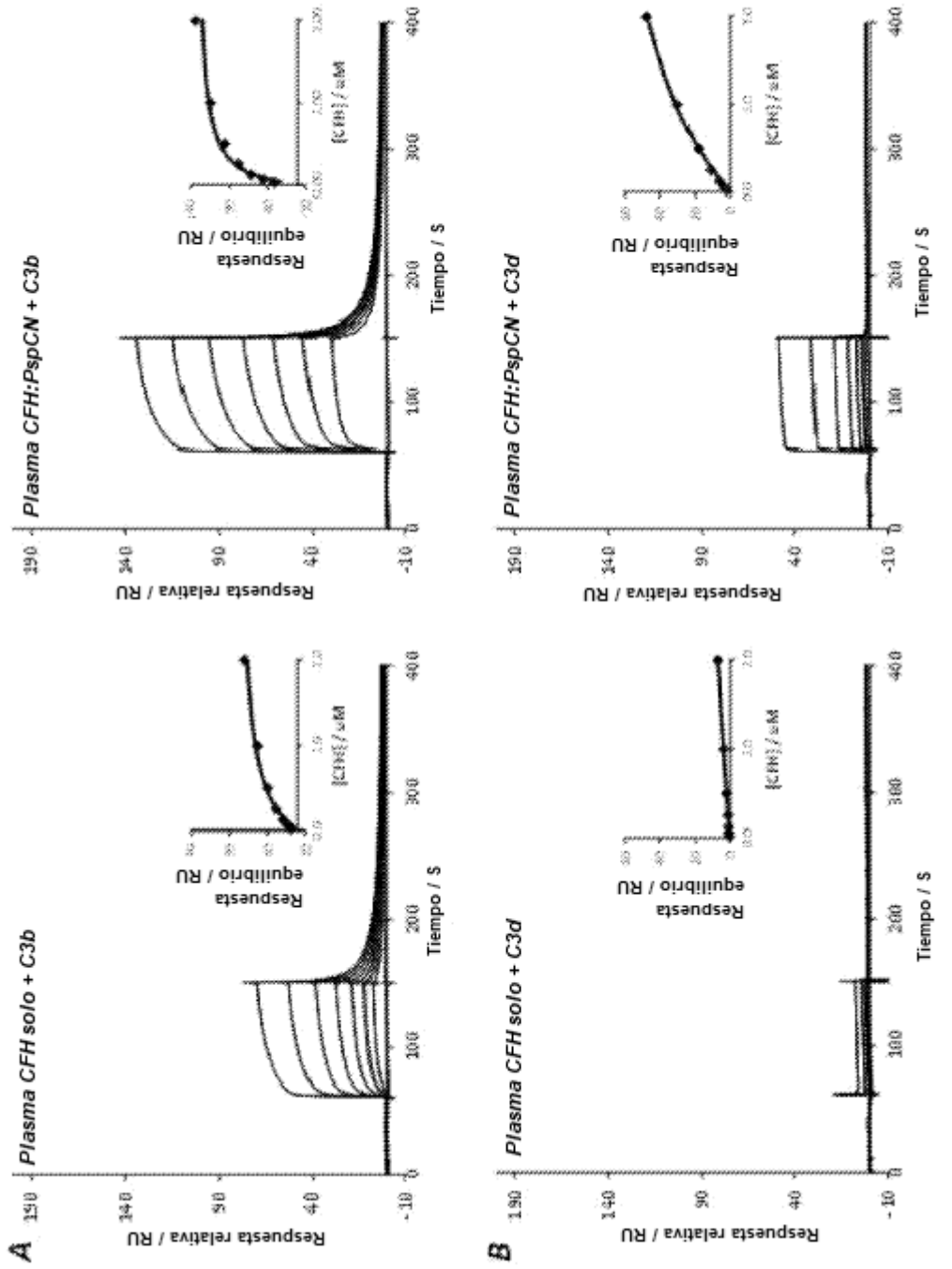

A
Plasma CFH solo + C3b
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
Respuesta equilibrio / RU
B
Plasma CFH solo + C3d
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
Respuesta equilibrio / RU
Plasma CFH:PspCN + C3b
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
Respuesta equilibrio / RU
Plasma CFH:PspCN + C3d
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
Respuesta equilibrio / RU

Fig 6

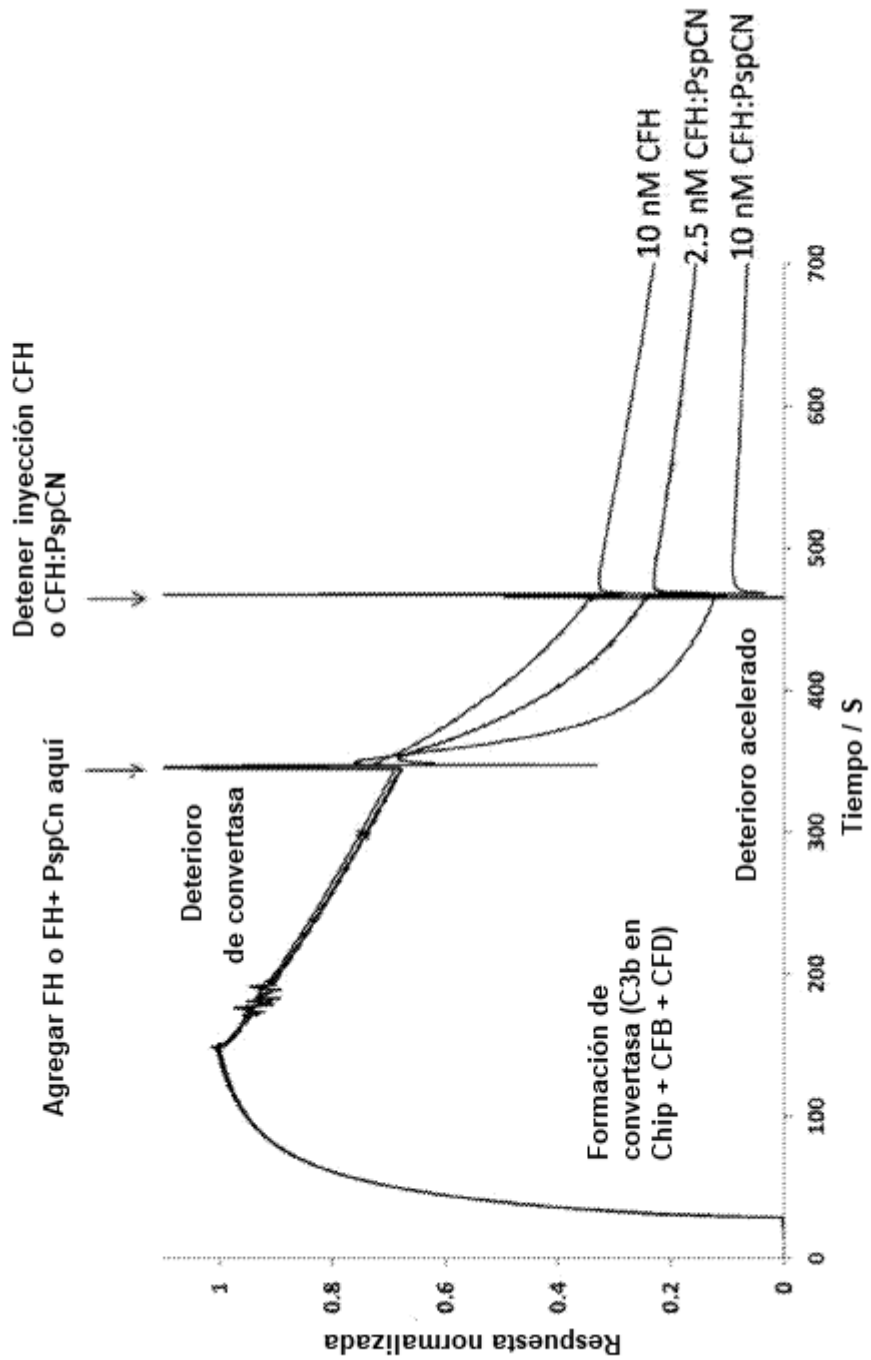

Detener inyección CFH
o CFH:PspCN
Agregar FH o FH+ PspCn aquí
Deterioro
de convertasa
Formación de
convertasa (C3b en
Chip + CFB + CFD)
Deterioro acelerado
10 nM CFH
2.5 nM CFH:PspCN
10 nM CFH:PspCN
Respuesta normalizada
Tiempo / S
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
0
100
200
300
400
500
600
700

Fig 7

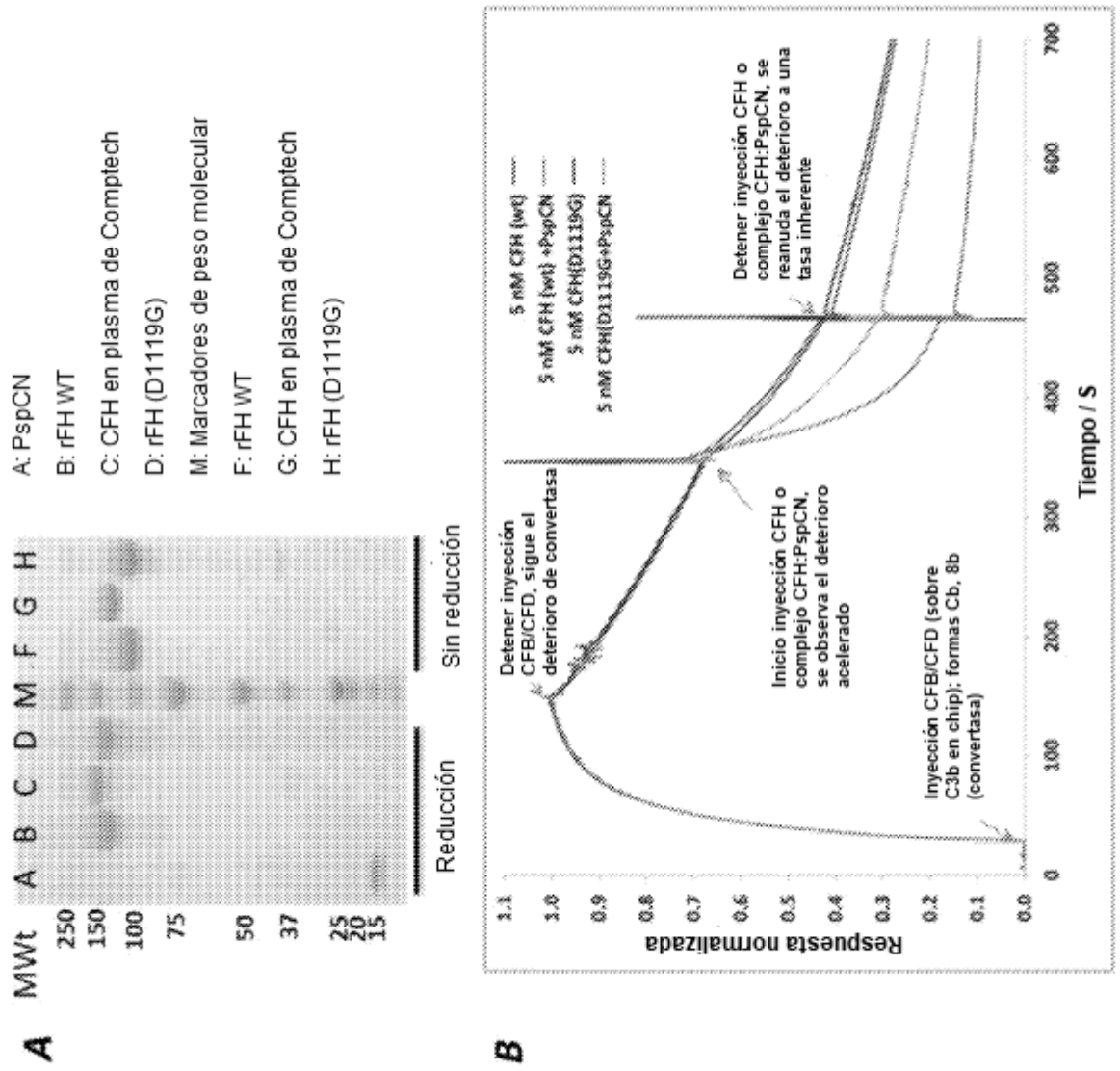
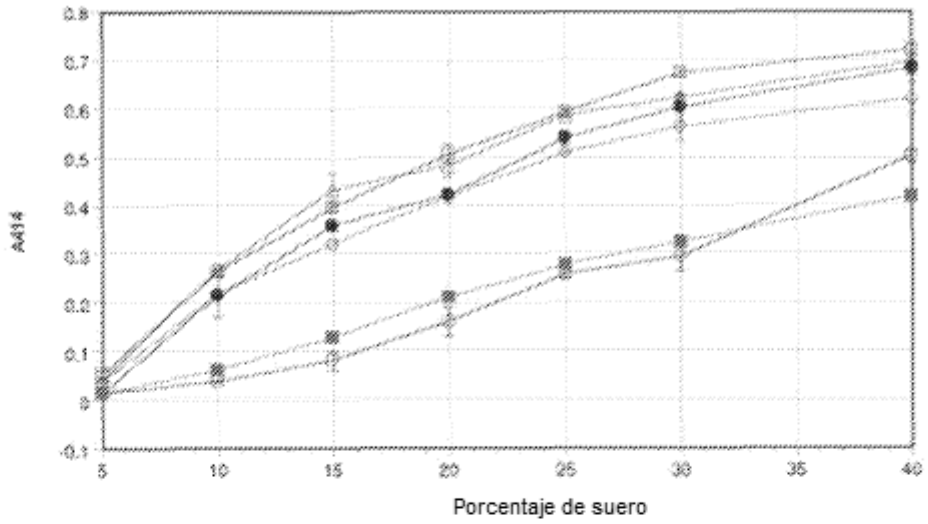

A
MWt
A B C D M F G H
250
150
100
75
50
37
25
20
15
Reducción
Sin reducción
A: PspCN
B: rFH WT
C: CFH en plasma de Comptech
D: rFH (D1119G)
M: Marcadores de peso molecular
F: rFH WT
G: CFH en plasma de Comptech
H: rFH (D1119G)
B
Respuesta normalizada
Tiempo / S
5 nM CFH (wt) ·····
5 nM CFH (wt) +PspCN ·····
5 nM CFH(D1119G) ·····
5 nM CFH(D1119G+PspCN ·····
Detener inyección CFB/CFD, sigue el deterioro de convertasa
Inicio inyección CFH o complejo CFH:PspCN, se observa el deterioro acelerado
Detener inyección CFH o complejo CFH:PspCN, se reanuda el deterioro a una tasa inherente
Inyección CFB/CFD (sobre C3b en chip): formas Cb, 8b (convertasa)

Fig 8

C



D

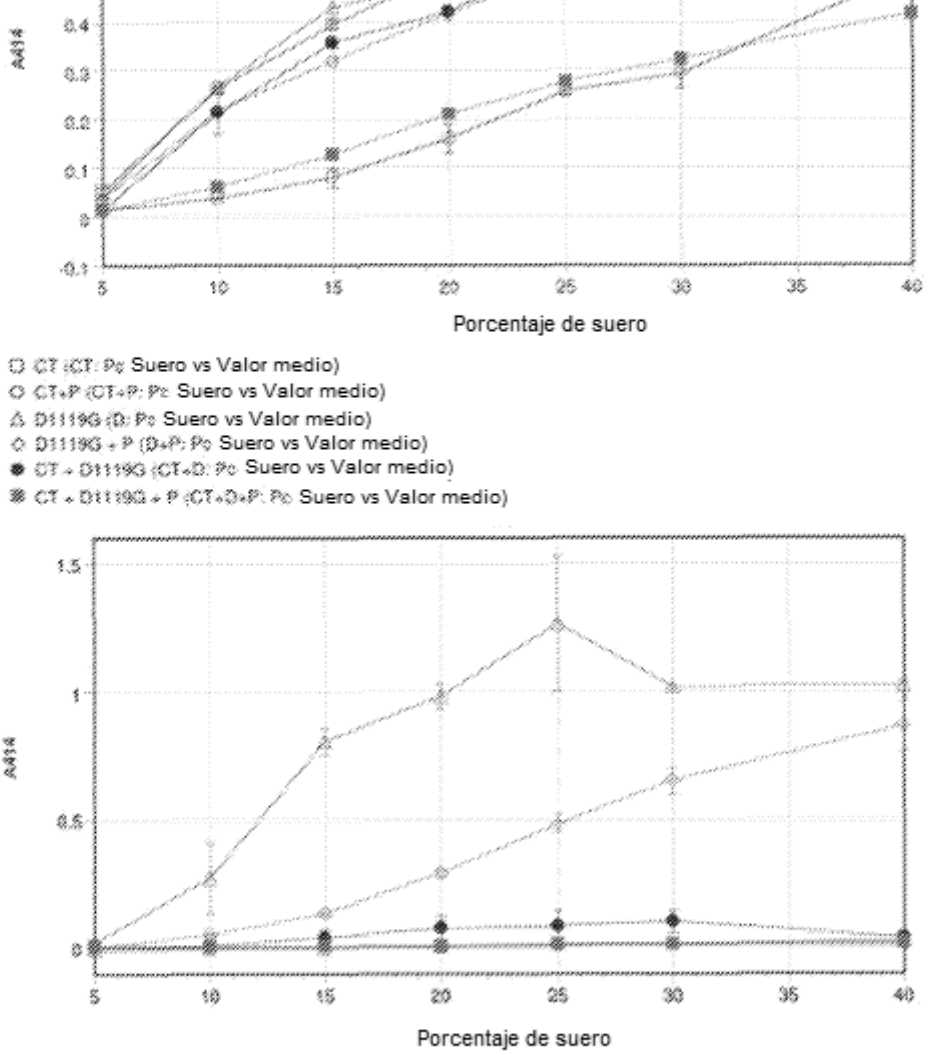


Fig. 8 Continuación

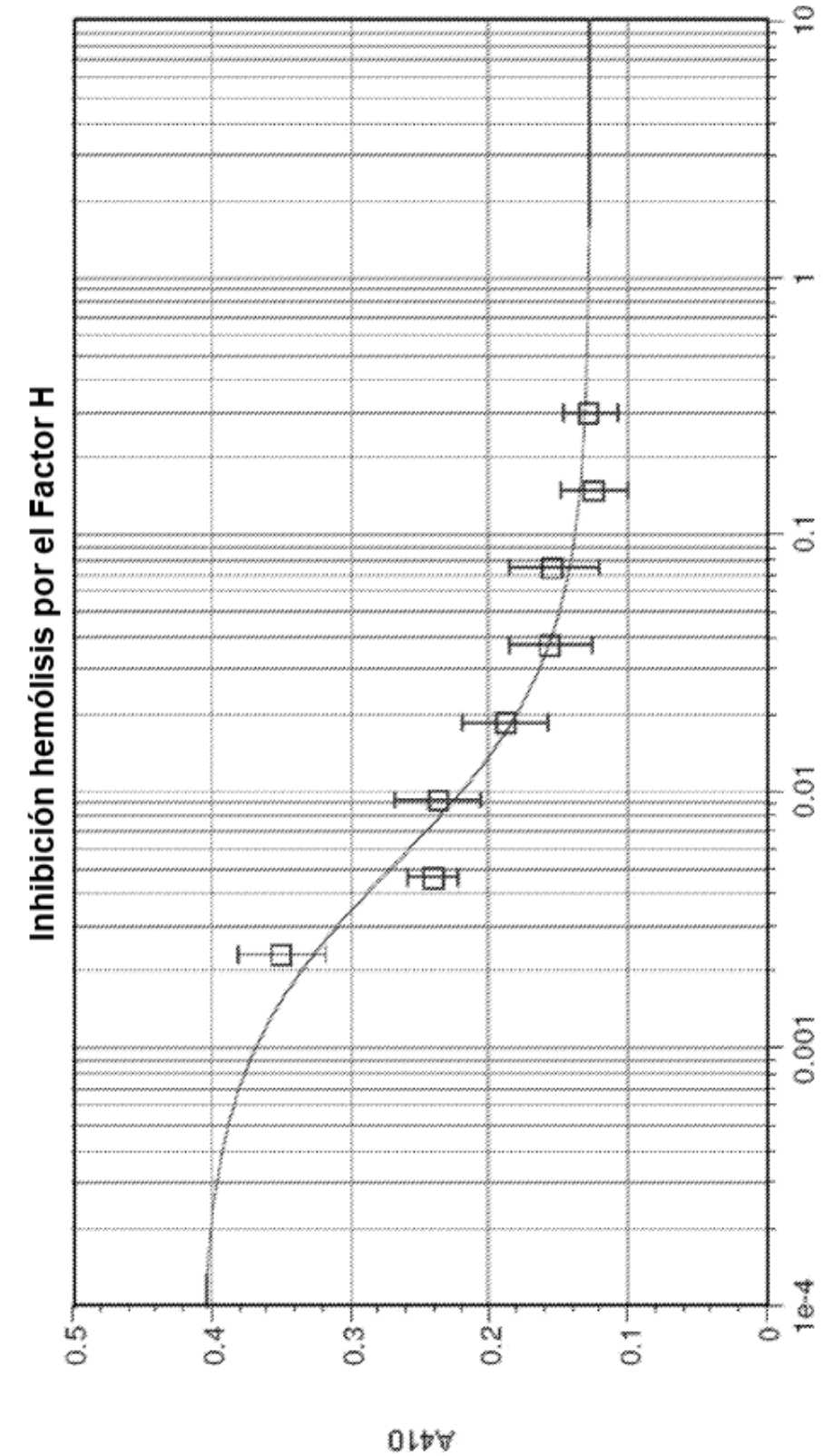

Inhibición hemólisis por el Factor H
A410
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1e-4
0.001
0.01
0.1
1
10
[Factor H] / uM

Fig 9A

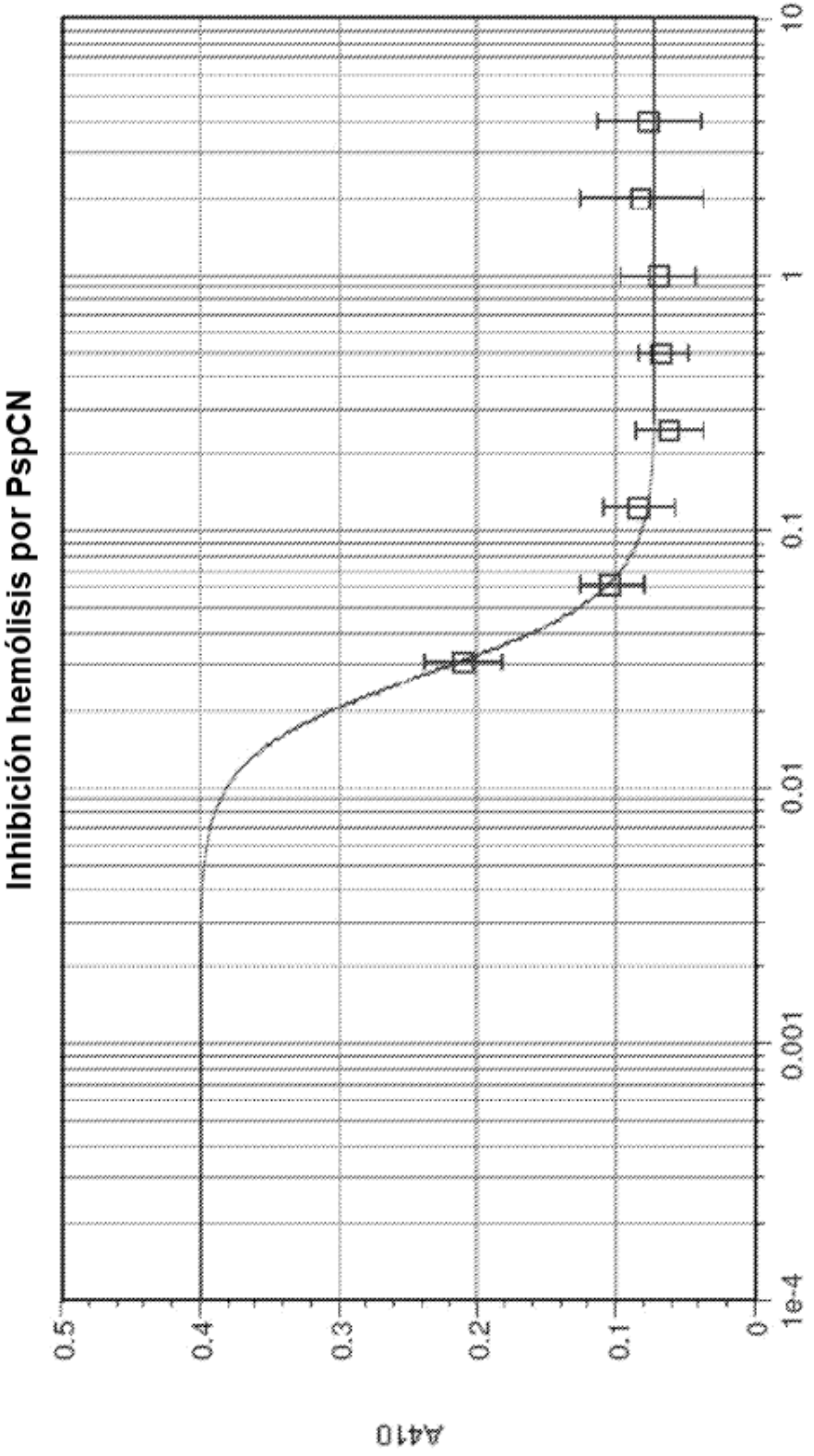

Inhibición hemólisis por PspCN
A410
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1e-4
0.001
0.01
0.1
1
10
[PspCN] / uM

Fig 9B

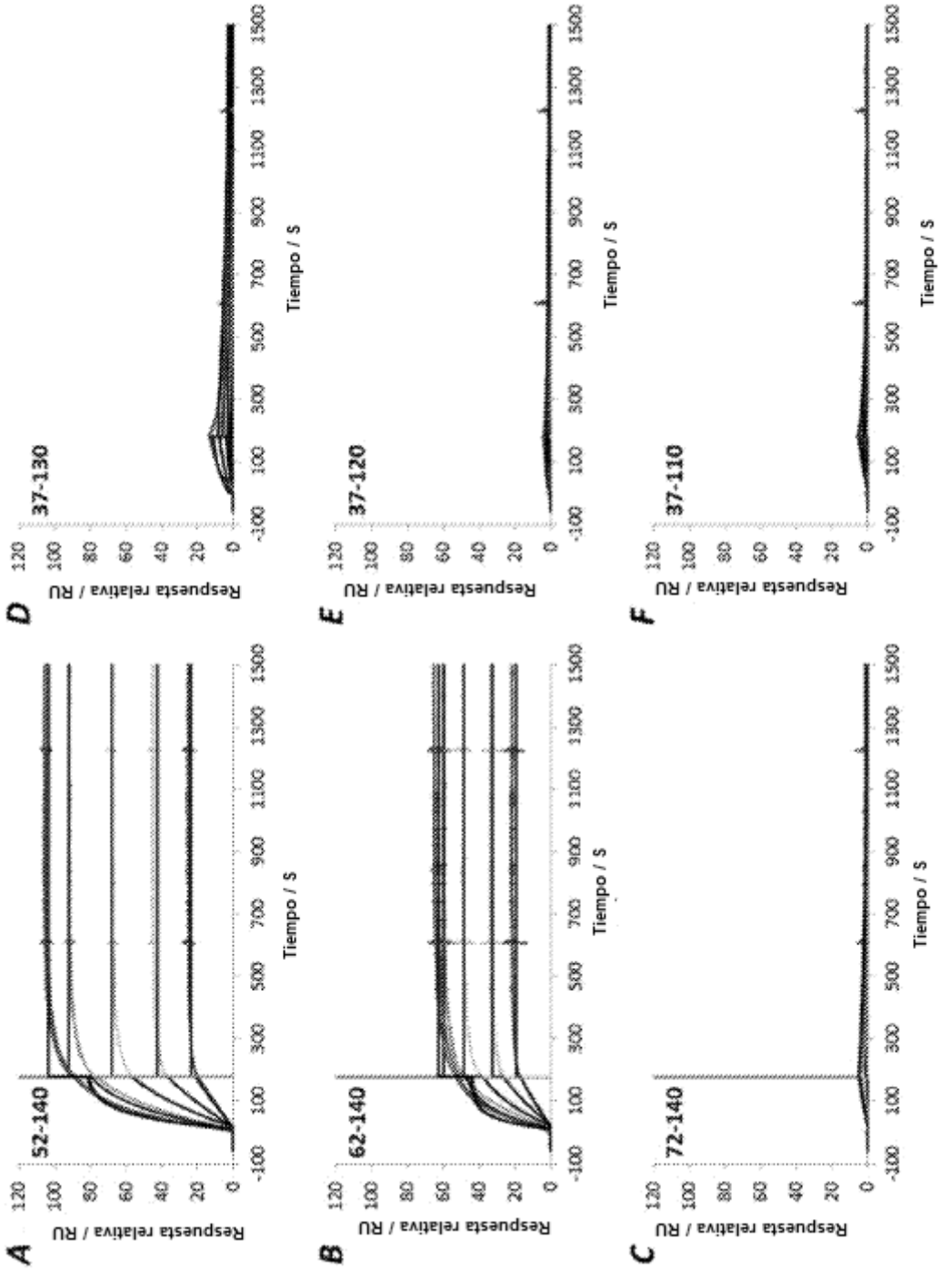

A
52-140
B
62-140
C
72-140
D
37-130
E
37-120
F
37-110
Respuesta relativa / RU
Tiempo / s

Fig 10

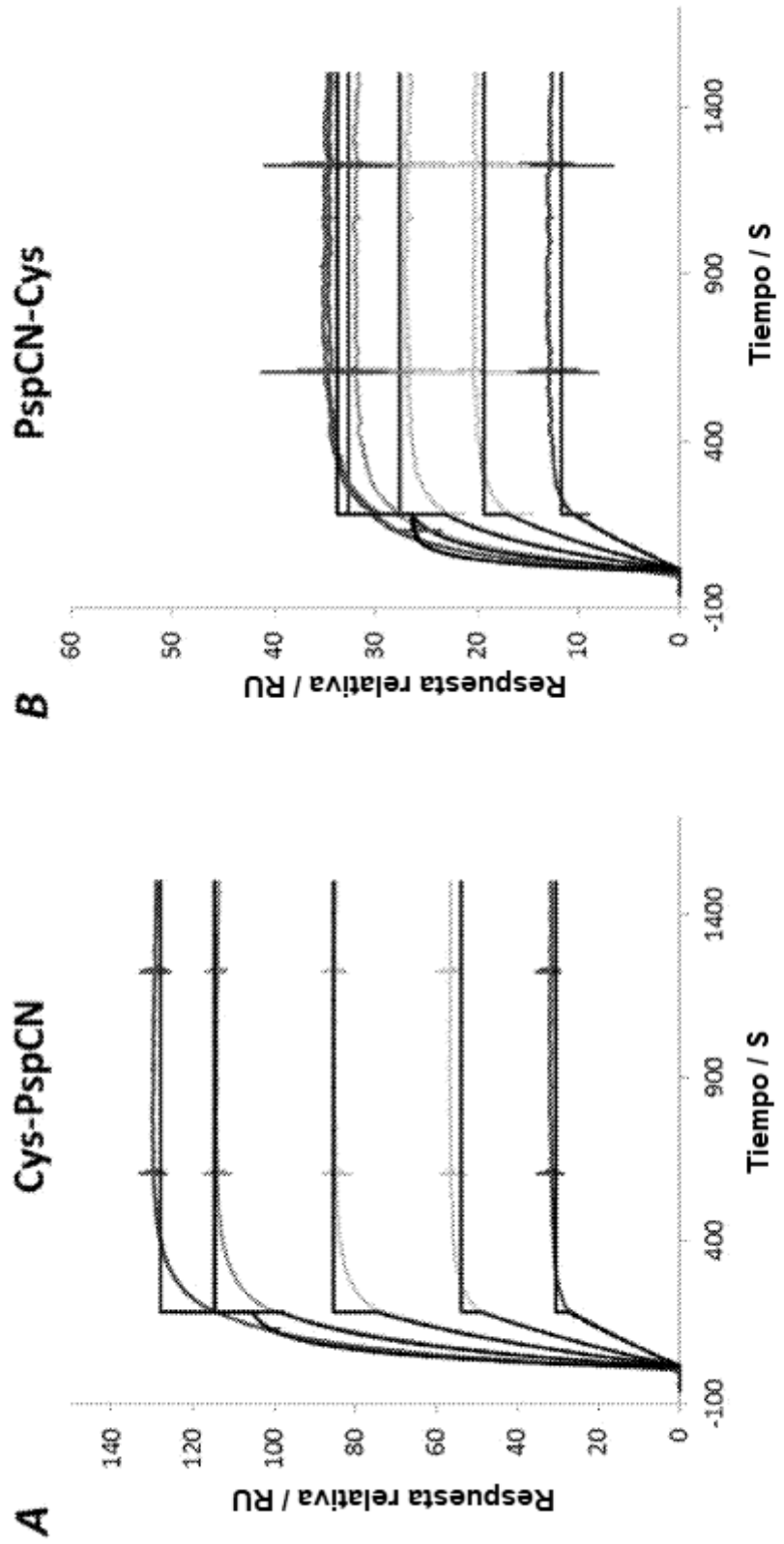

A
Cys-PspCN
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
B
PspCN-Cys
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S

Fig 11

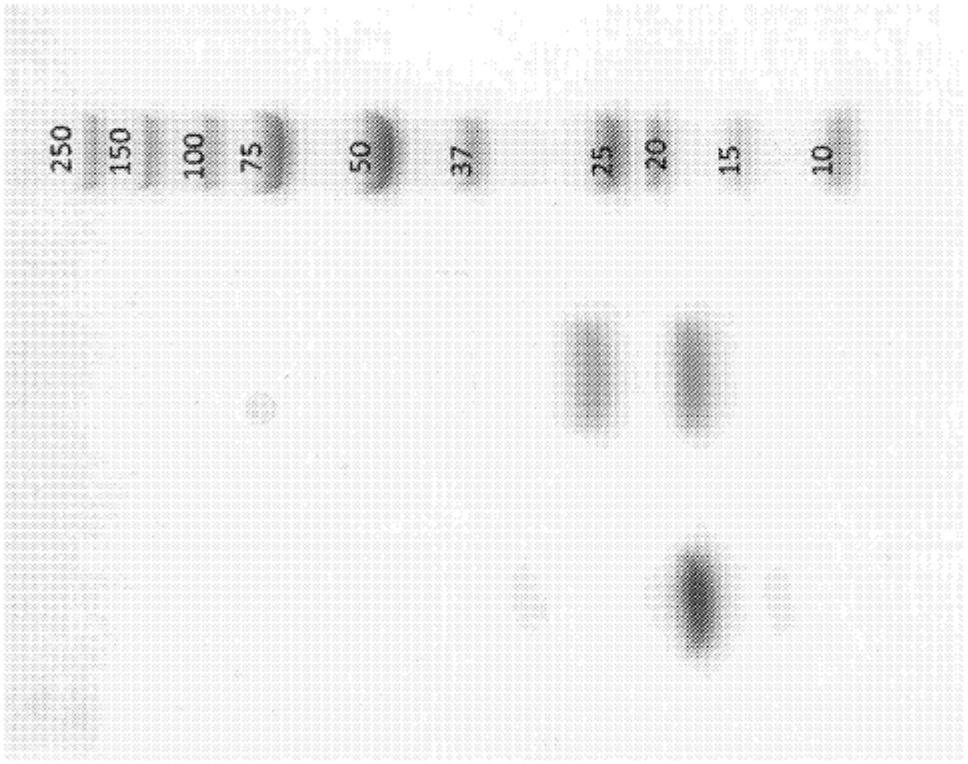


Fig 12

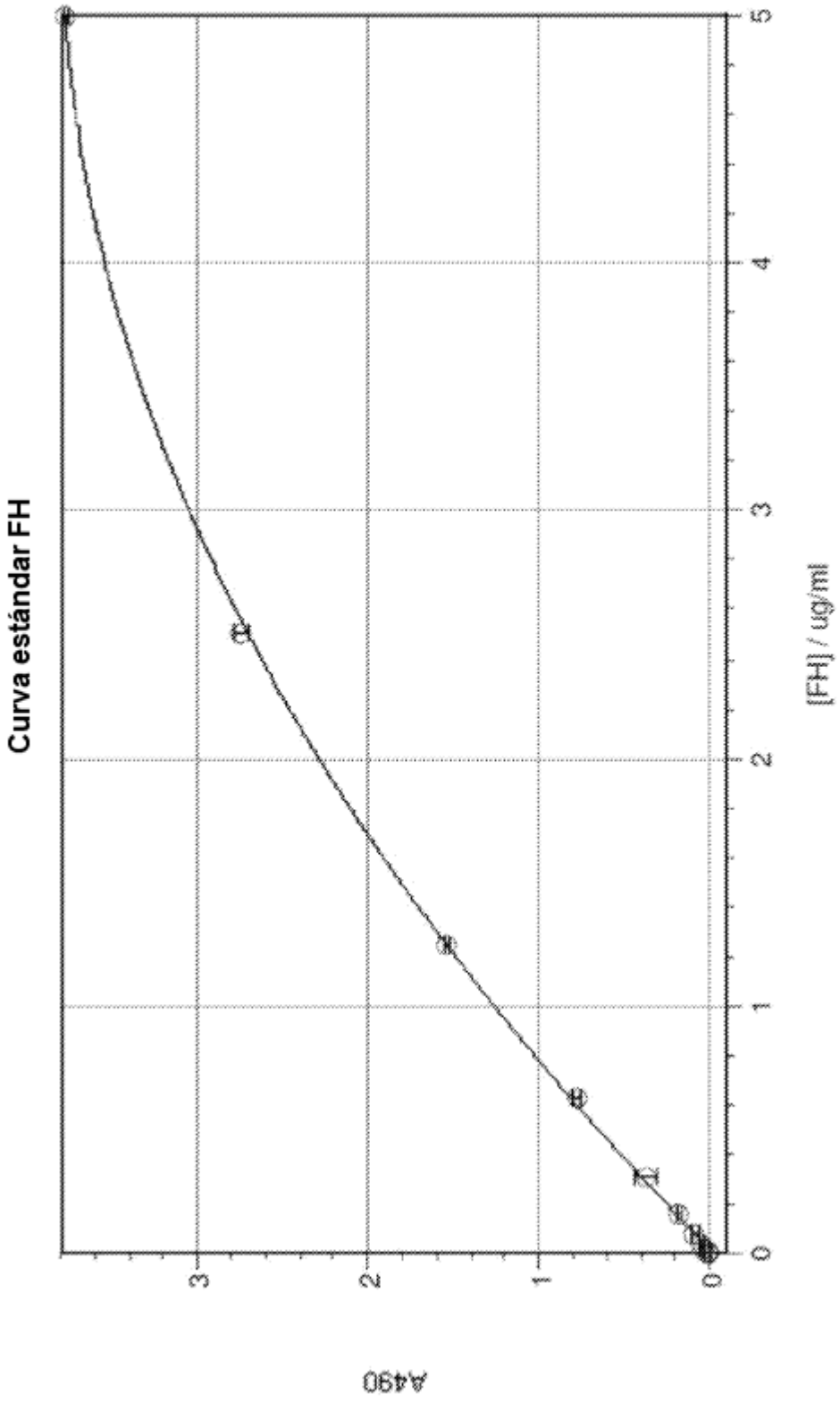


Fig 13 A

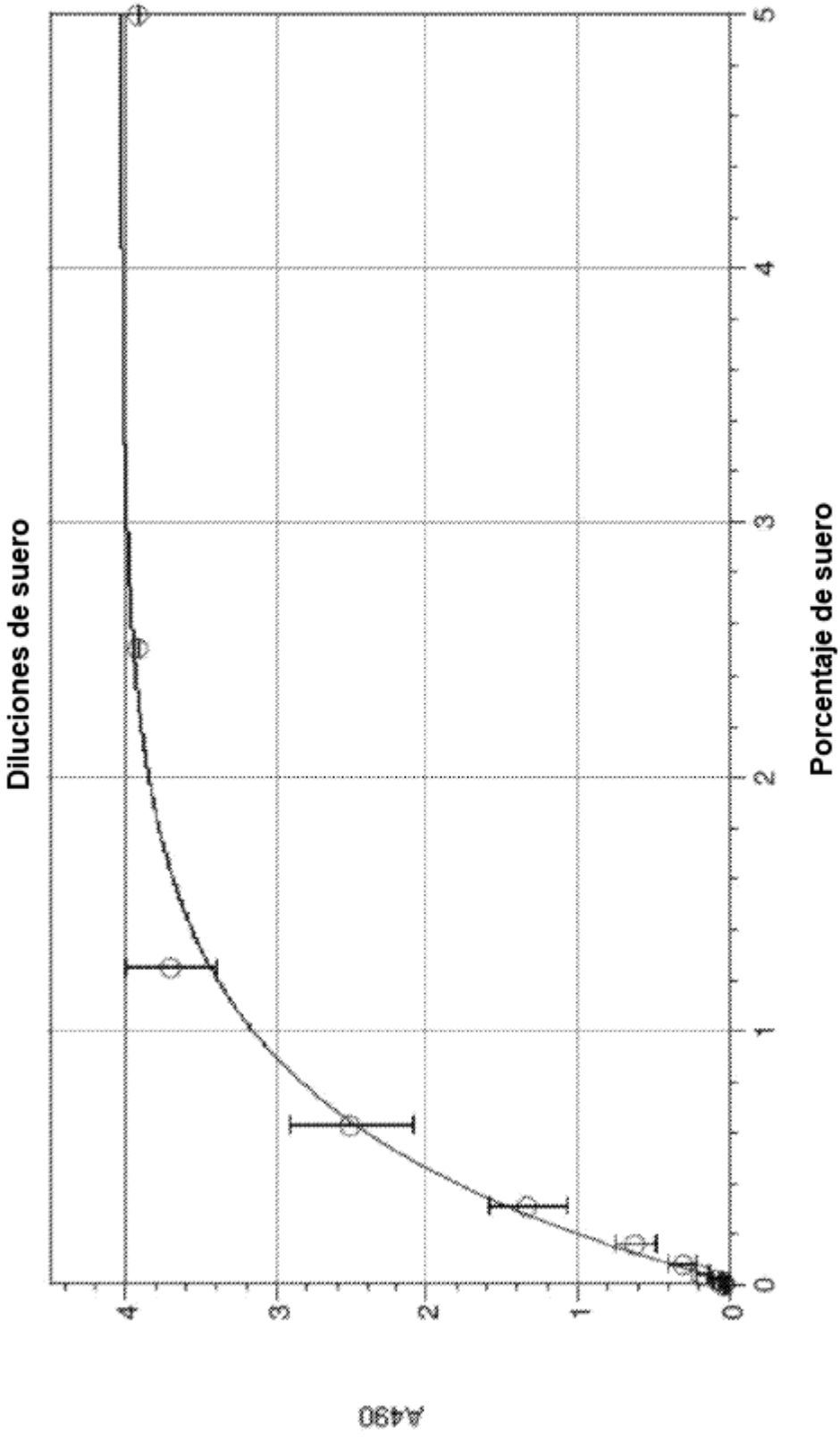


Fig 13 B

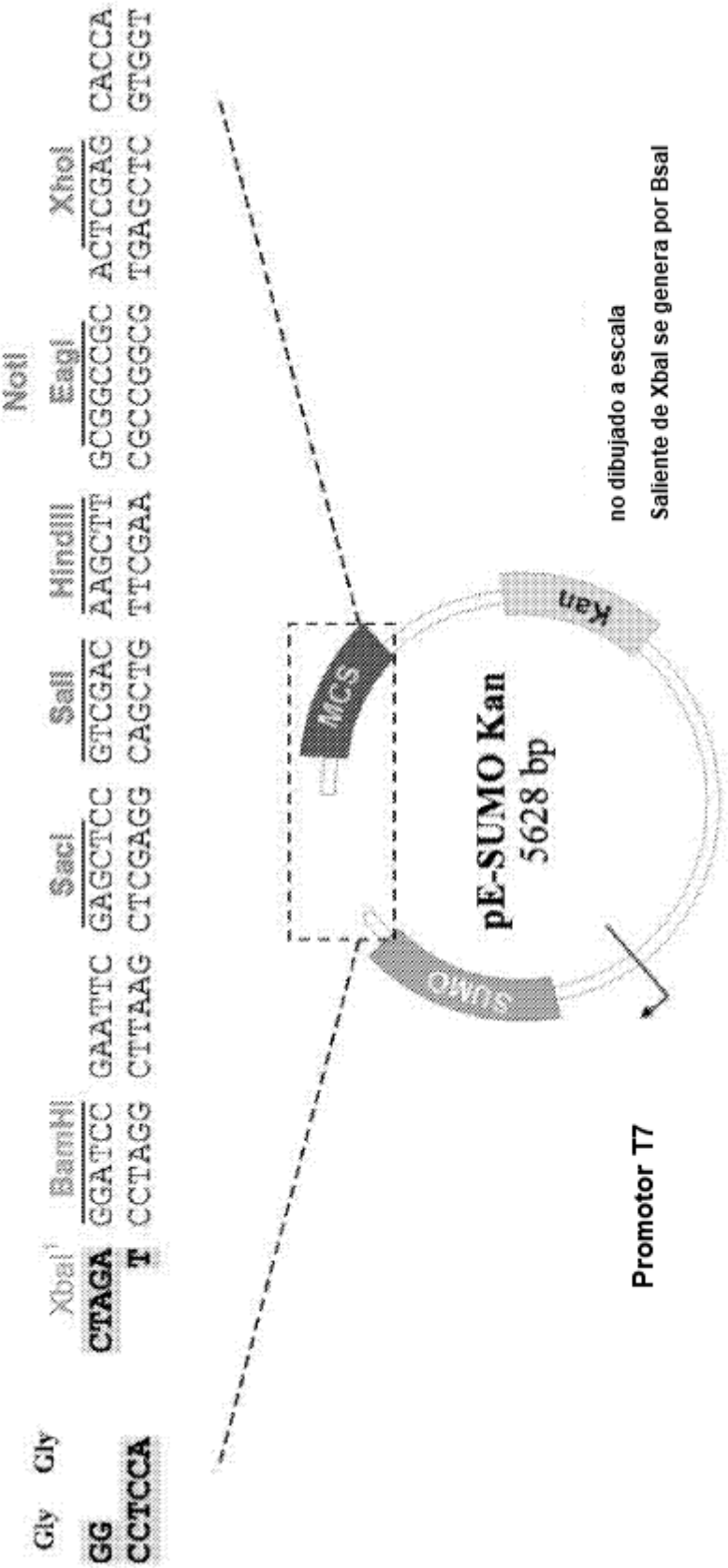

Gly Gly
GG
CCTCCA
XbaI'
CTAGA
T
BamHI
GGATCC
CCTAGG
EcoRI
GAATTC
CTTAAG
SacI
GAGCTCC
CTCGAGG
SalI
GTCGAC
CAGCTG
HindIII
AAGCTT
TTCGAA
NotI
EagI
GCGGCCGC
CGCCGGCG
XhoI
ACTCGAG
TGAGCTC
CACCA
GTGGT
MCS
pE-SUMO Kan
5628 bp
Kan
ORIS
Promotor T7
no dibujado a escala
Saliente de XbaI se genera por BsaI

Fig 14

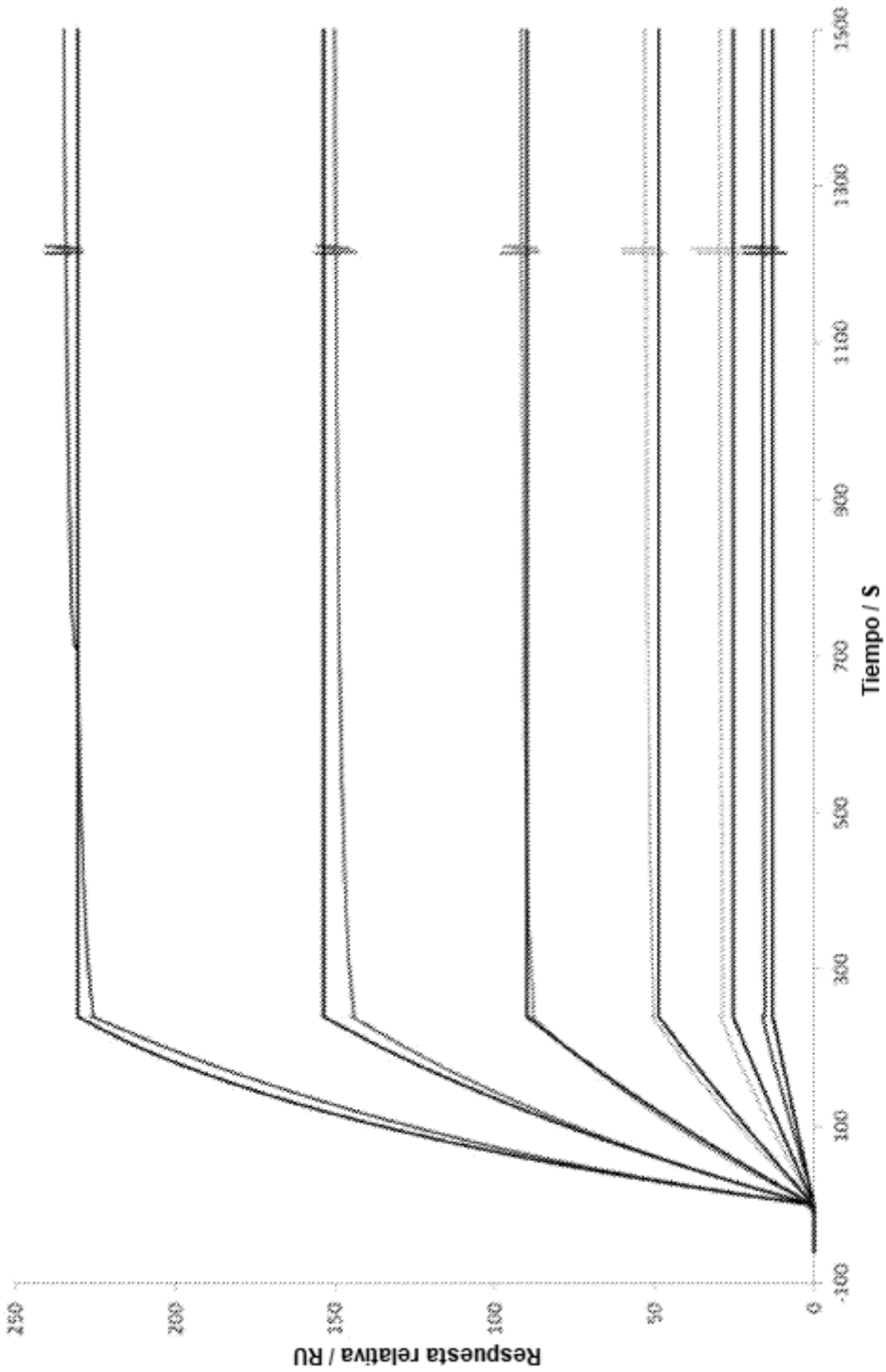

Respuesta relativa / RU
250
200
150
100
50
0
-100
100
300
500
700
900
1100
1300
1500
Tiempo / s

Fig 15

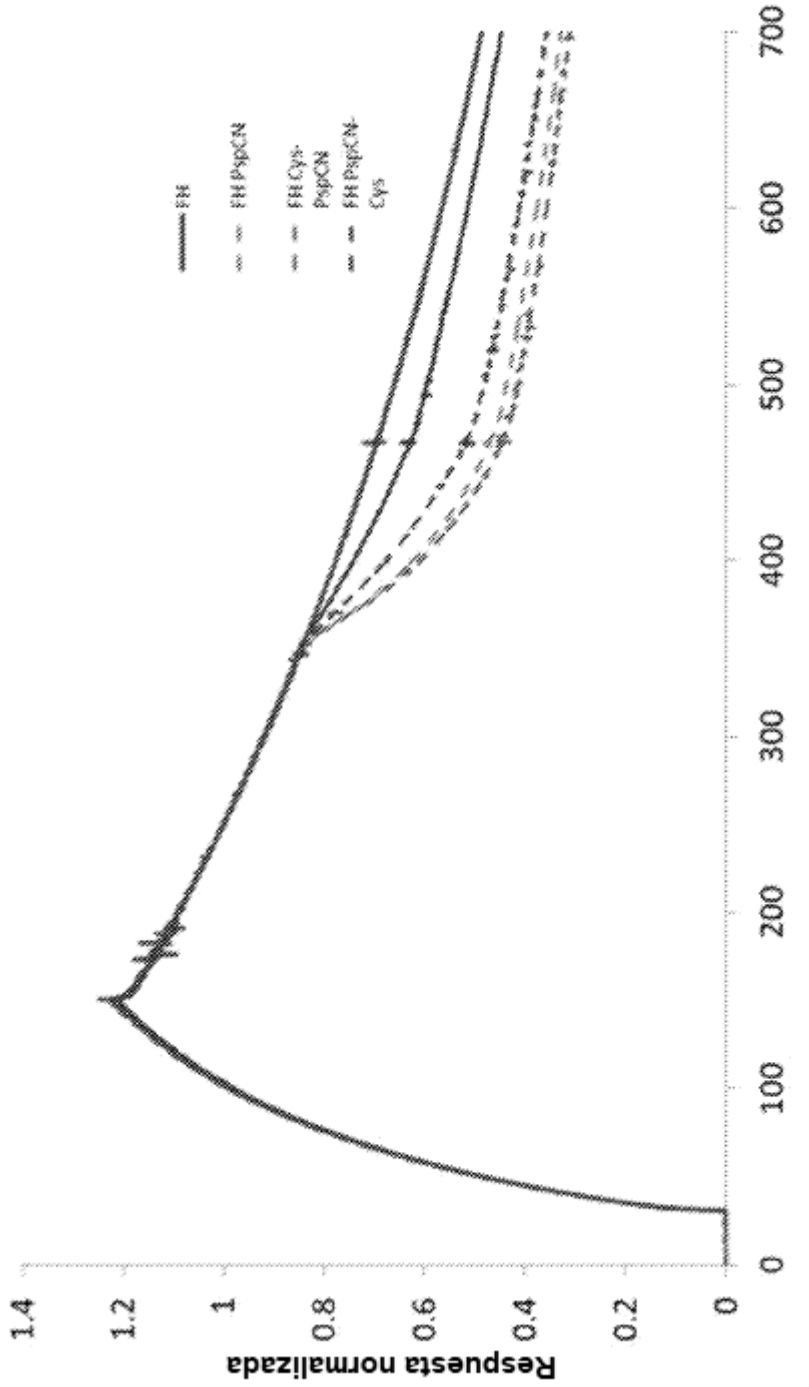

Respuesta normalizada
Tiempo / s
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
0
100
200
300
400
500
600
700
FH
FH PspCN
FH Cys-PspCN
FH PspCN-Cys

Fig 16

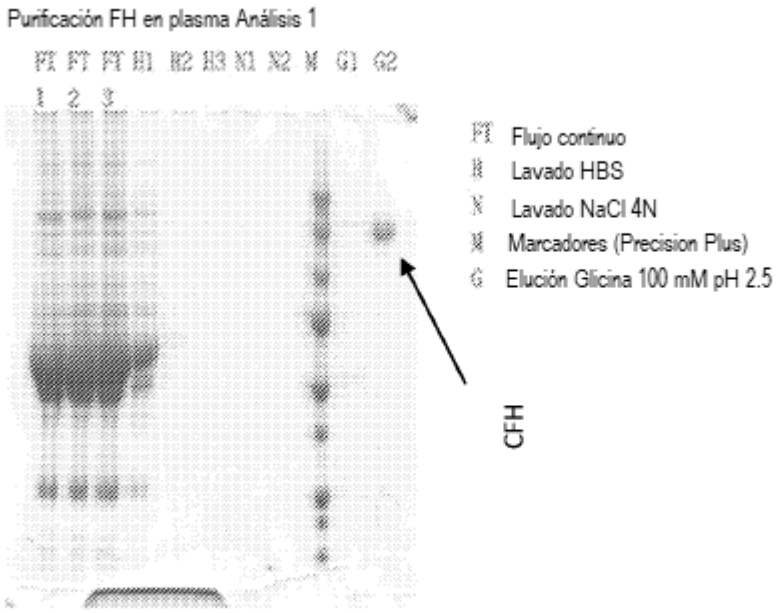
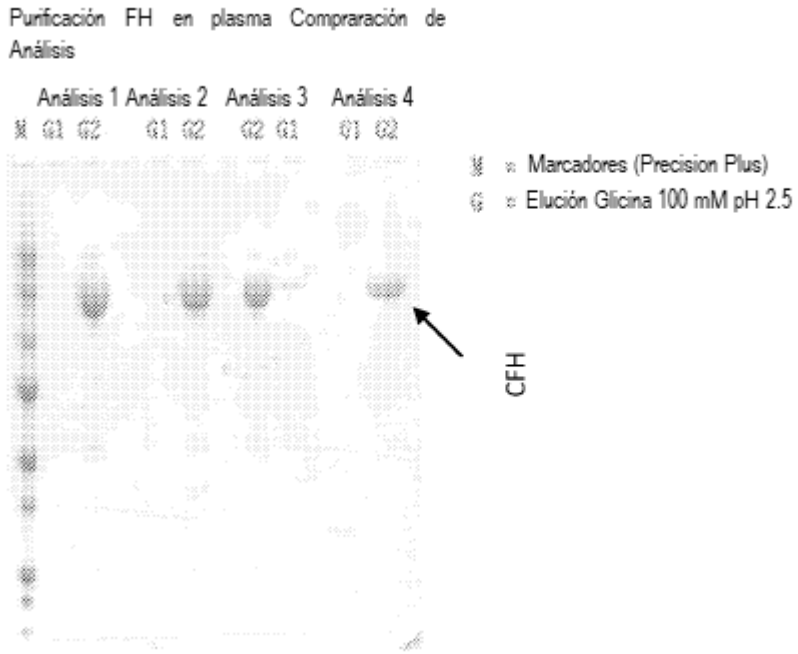

Purificación FH en plasma Análisis 1
FT FT FT H1 H2 H3 N1 N2 M G1 G2
1 2 3
FT Flujo continuo
H Lavado HBS
N Lavado NaCl 4N
M Marcadores (Precision Plus)
G Elución Glicina 100 mM pH 2.5
CFH

Fig 17


Purificación FH en plasma Compraración de Análisis
Análisis 1 Análisis 2 Análisis 3 Análisis 4
M G1 G2 G1 G2 G2 G1 G1 G2
M = Marcadores (Precision Plus)
G = Elución Glicina 100 mM pH 2.5
CFH

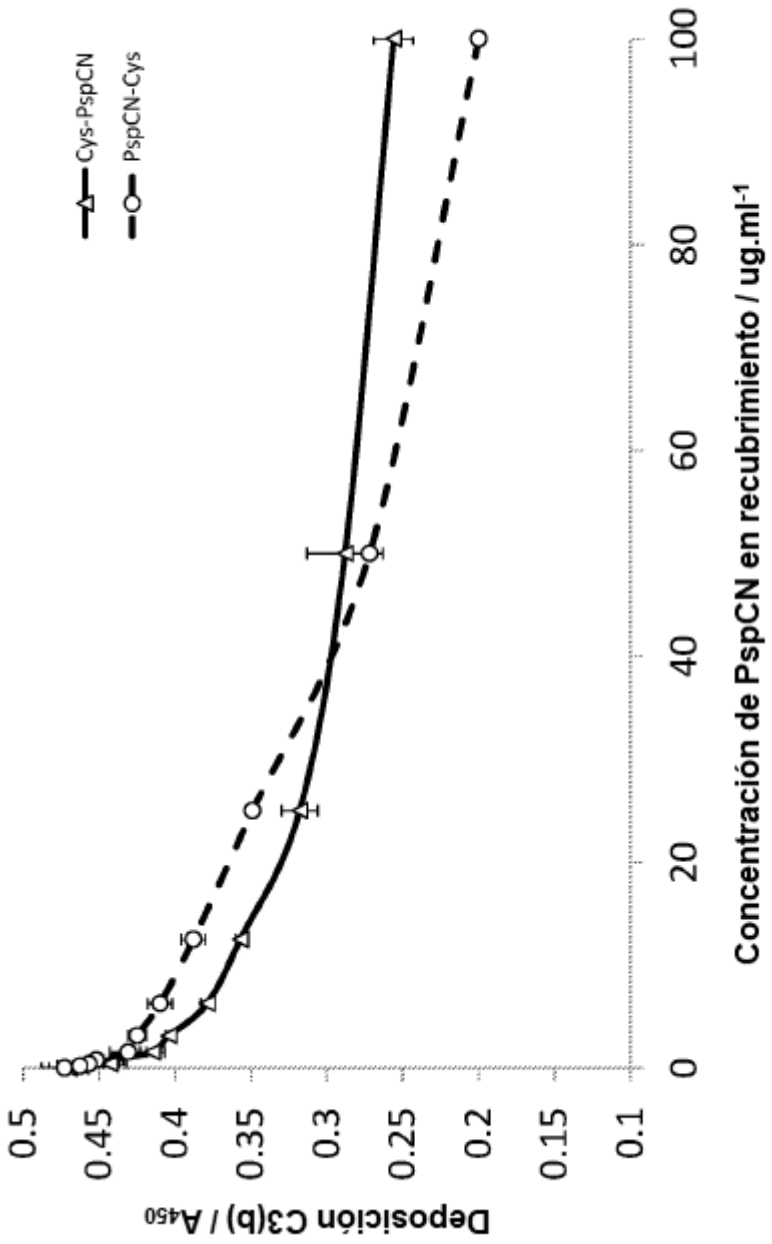

Cys-PspCN
PspCN-Cys
Deposición C3(b) / A450
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0
20
40
60
80
100
Concentración de PspCN en recubrimiento / ug.ml-1

Fig 18

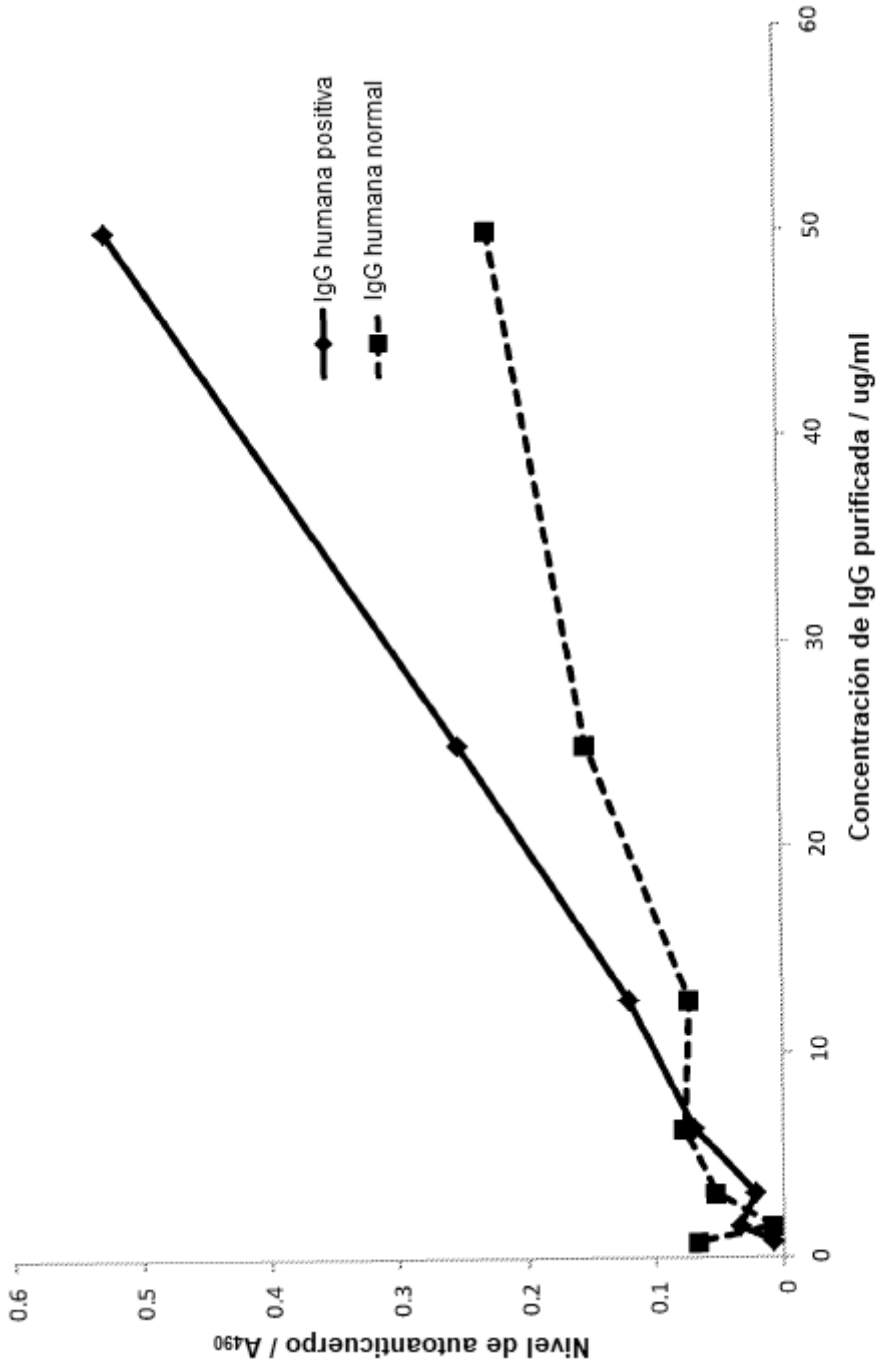

IgG humana positiva
IgG humana normal
Nivel de autoanticuerpo / A490
Concentración de IgG purificada / ug/ml
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0
10
20
30
40
50
60

Fig 19

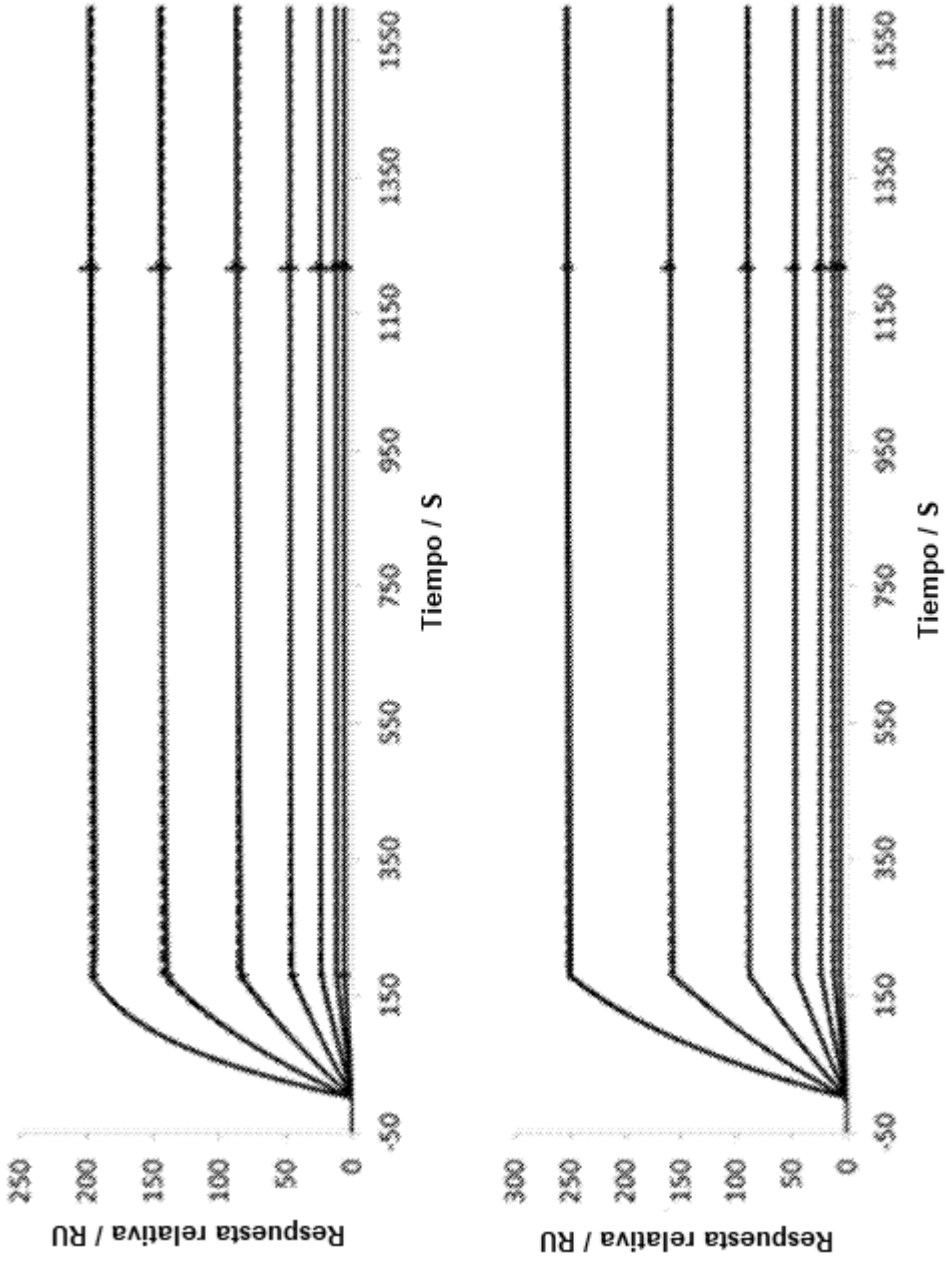

Respuesta relativa / RU
250
200
150
100
50
0
-50
150
350
550
750
950
1150
1350
1550
Tiempo / S
Respuesta relativa / RU
300
250
200
150
100
50
0
-50
150
350
550
750
950
1150
1350
1550
Tiempo / S

Fig 20

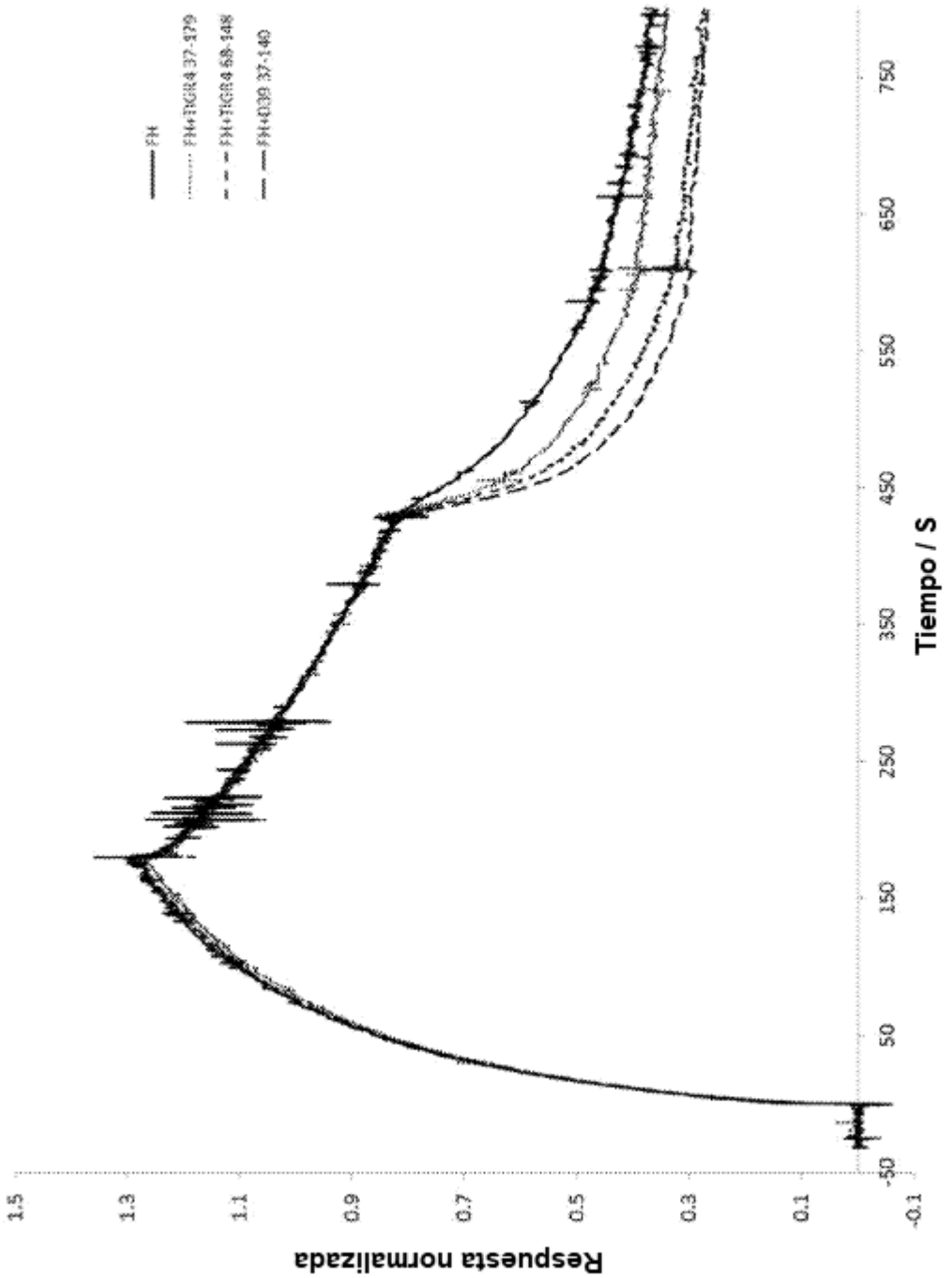

FH
FH+TIGIT 37-179
FH+TIGIT 68-148
FH+039 37-140
Respuesta normalizada
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
-0.1
-50
50
150
250
350
450
550
650
750
Tiempo / s

Fig 21

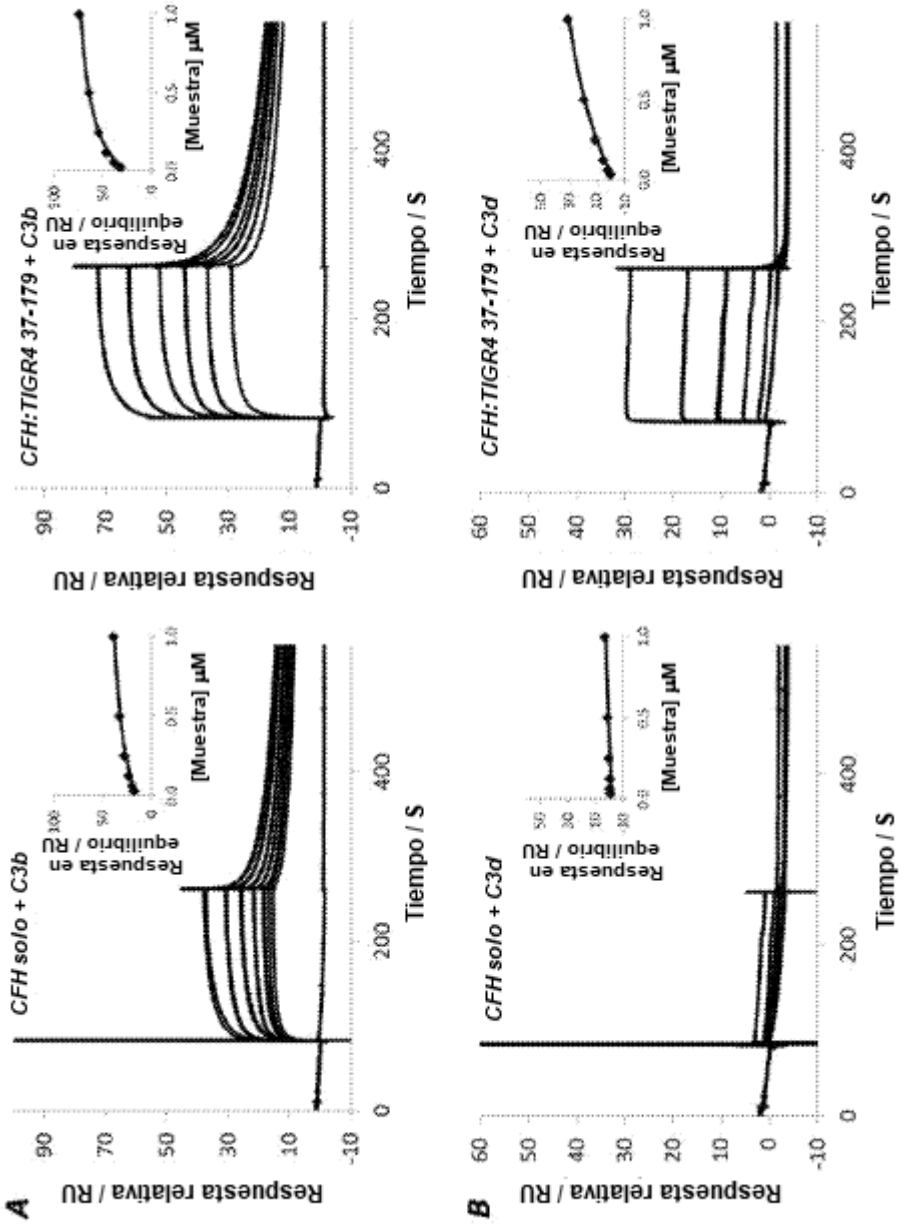

A
CFH solo + C3b
Respuesta relativa / RU
Tiempo / S
Respuesta en equilibrio / RU
[Muestra] µM
B
CFH solo + C3d
CFH:TIGR4 37-179 + C3b
CFH:TIGR4 37-179 + C3d

Fig 22

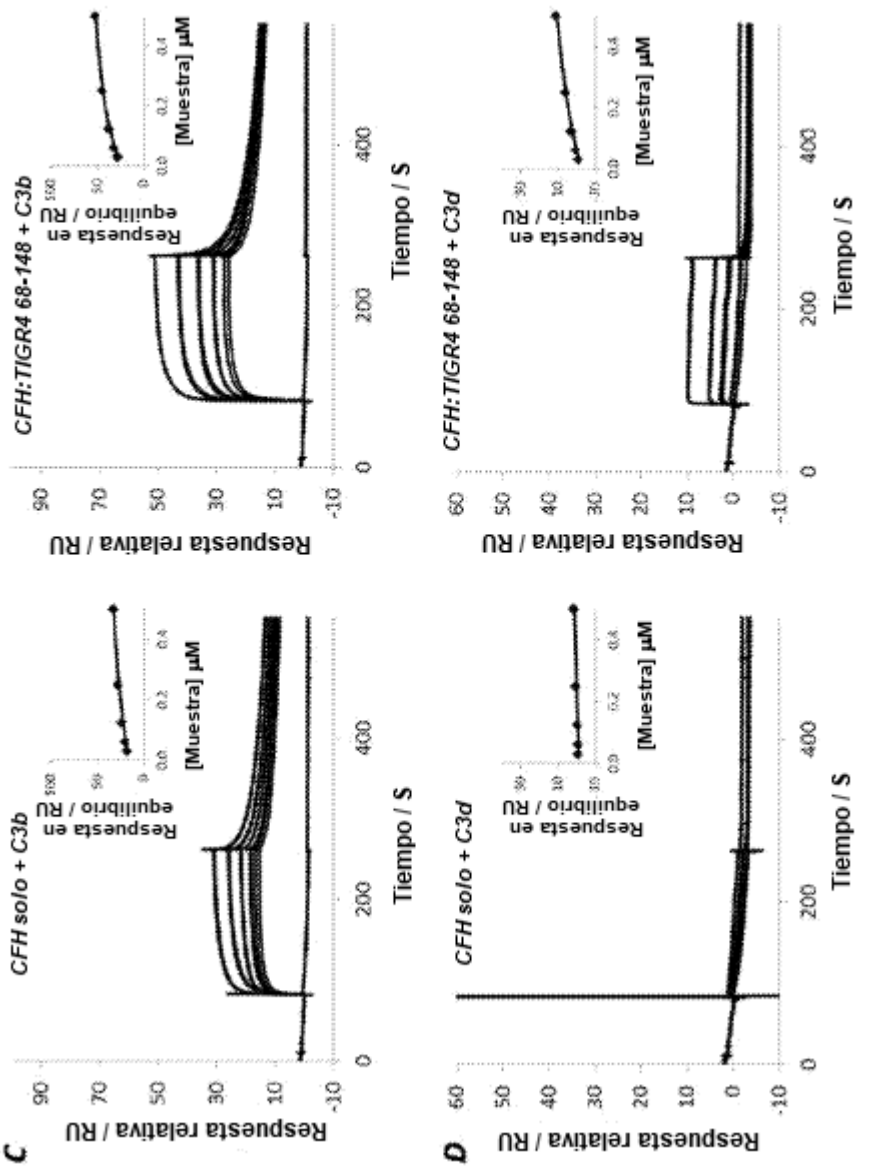


Fig. 22 Continuación