

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 471**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2009 PCT/US2009/043020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09137605**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2009 E 09743591 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2280996**

54 Título: **Variantes de CRlg de afinidad madurada**

30 Prioridad:

06.05.2008 US 50888 P
20.08.2008 US 189653 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

SIDHU, SACHDEV, S.;
LI, BING;
VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO y
WIESMANN, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 605 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de CRlg de afinidad madurada

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a variantes de CRlg de afinidad madurada. En particular, la invención se refiere a variantes de CRlg que tienen afinidad de unión aumentada a C3b y que retienen la unión selectiva a C3b sobre C3.

10 Antecedentes de la invención

El sistema del complemento

15 El sistema del complemento es una cascada compleja de enzimas compuesta por una serie de glucoproteínas de suero que normalmente existen en forma de pro-enzima inactiva. Tres rutas principales, la ruta clásica, la alternativa y la de lectina de unión a manosa, pueden activar el complemento, que se juntan a nivel de C3, donde dos C3 convertasas similares escinden C3 en C3a y C3b.

20 Los macrófagos son células especializadas que han desarrollado una capacidad innata de reconocer diferencias sutiles en la estructura de etiquetas de identificación expresadas en superficie celular, los llamados patrones moleculares (Taylor, et al., Eur J Immunol 33, 2090-1097 (2003); Taylor, et al., Annu Rev Immunol 23, 901-944 (2005)). Aunque el reconocimiento directo de estas estructuras superficiales es un aspecto fundamental de la inmunidad innata, la opsonización permite que los receptores de macrófagos genéricos medien la internalización, aumentando la eficacia y diversificando el repertorio de reconocimiento del fagocito (Stuart y Ezekowitz, Immunity 22, 539-550 (2005)). El proceso de fagocitosis implica múltiples interacciones ligado-receptor, y ahora está claro que diversas opsoninas, incluyendo inmunoglobulinas, colectinas y componentes del complemento, guían las actividades celulares requeridas para la internalización del patógeno a través de la interacción con receptores de superficie celular de macrófagos (revisado por Aderem y Underhill, Annu Rev Immunol 17, 593-623 (1999); Underhill y Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825-852 (2002)). Aunque las inmunoglobulinas naturales codificadas por genes de la línea germinal pueden reconocer una amplia diversidad de patógenos, la mayoría de las IgG opsonizantes se generan a través de inmunidad adaptativa y, por lo tanto, la eliminación eficaz a través de los receptores Fc no es inmediata (Carroll, Nat Immunol 5, 981-986 (2004)). El complemento, por otro lado, reconoce rápidamente las moléculas de superficie de los patógenos y sensibiliza a la partícula para su captación por receptores del complemento (Brown, Infect Agents Dis 1,63-70 (1991)).

35 El complemento consiste en más de 30 proteínas de suero que opsonizan una amplia diversidad de patógenos para el reconocimiento por receptores del complemento. Dependiendo del desencadenante inicial de la cascada, pueden distinguirse tres rutas (revisado por (Walport, N Engl J Med 344, 1058-1066 (2001)). Las tres comparten la etapa común de activar el componente central C3, pero difieren de acuerdo con la naturaleza del reconocimiento y las etapas bioquímicas iniciales que conducen a la activación de C3. La ruta clásica se activa por anticuerpos unidos a la superficie del patógeno, que a su vez se unen al componente del complemento C1q, poniendo en marcha una cascada de serina proteasa que finalmente escinde C3 en su forma activa, C3b. La ruta lectina se activa después del reconocimiento de motivos de carbohidrato por proteínas lectina. Hasta la fecha, se han identificado tres miembros de esta ruta: lectinas de unión a manosa (MBL), la familia SIGN-R1 de lectinas y las ficolinas (Pyz et al., Ann Med 38, 242-251 (2006)). Tanto las MBL como las ficolinas se asocian a serina proteasas, que actúan como C1 en la ruta clásica, activando los componentes C2 y C4 que conducen a la etapa central C3. La ruta alternativa contrata con ambas rutas, la clásica y de lectina, en que se activa debido a reacción directa del éster de C3 interno con motivos de reconocimiento sobre la superficie del patógeno. La unión inicial de C3 a una superficie activadora conduce a rápida amplificación de deposición de C3b a través de la acción de las proteasas Factor B y Factor D de la ruta alternativa. De forma importante, C3b depositado por la ruta clásica o de lectina también puede conducir a amplificación de deposición de C3b a través de las acciones de Factores B y D. En las tres rutas de activación del complemento, la etapa central en la opsonización es la conversión del componente C3 en C3b. La escisión de C3 por enzimas de las cascadas del complemento expone al tioéster a ataque nucleófilo, permitiendo la unión covalente de C3b en superficies antigénicas mediante el dominio tioéster. Esta es la etapa inicial en la opsonización del complemento. La posterior proteólisis del C3b unido produce iC3b, C3c y C3dg, fragmentos que se reconocen por diferentes receptores (Ross y Medof, Adv Immunol 37, 217-267 (1985)). Esta escisión anula la capacidad de C3b de amplificar adicionalmente la deposición de C3b y activar los componentes posteriores de la cascada del complemento, incluyendo el complejo de ataque a membrana, capaz de dar la membrana directamente. Sin embargo, los receptores fagocíticos de macrófagos reconocen C3b y sus fragmentos de forma preferente; debido a la versatilidad de la formación del enlace éster, la opsonización mediada por C3 es central para el reconocimiento del patógeno (Holers et al., Immunol Today 13, 231-236 (1992)), y receptores para los diversos productos de degradación de C3, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria del hospedador.

65 El propio C3 es una proteína compleja y flexible que consiste en 13 dominios distintos. El núcleo de la molécula está compuesto por 8 dominios llamados de macroglobulina (MG), que constituyen las cadenas α y β fuertemente empaquetadas de C3. Insertados en esta estructura están los dominios CUB (C1r/C1s, Uegf y Bone morphogenetic

protein-1 (proteína morfogénica-1 de huesos)) y TED, conteniendo el último el enlace tioéster que permite la asociación covalente de C3b con las superficies del patógeno. Los dominios restantes contienen C3a o actúan como enlazadores y espaciadores de los dominios centrales. La comparación de las estructuras de C3b y C3c con C3 demuestran que la molécula experimenta reordenamientos conformacionales principales con cada proteólisis, que expone no solamente el TED, sino nuevas superficies adicionales de la molécula que pueden interaccionar con receptores celulares (Janssen y Gros, *Mol Immunol* 44, 3-10 (2007)).

Receptores de C3 del complemento en células fagocíticas

Existen tres superfamilias génicas conocidas de receptores del complemento: Los módulos de repetición consenso corta (SCR) que codifican CR1 y CR2, los miembros de la familia de beta-2 integrina CR3 y CR4, y el miembro de la superfamilia de inmunoglobulina Ig CR1g.

CR1 es una glucoproteína de 180-210 kDa que consiste en 30 repeticiones consenso cortas (SCR) y desempeña un papel principal en la eliminación del complejo inmunitario. Las SCR son estructuras modulares de aproximadamente 60 aminoácidos, cada una con dos pares de enlaces disulfuro que proporcionan rigidez estructural. La unión de alta afinidad tanto a C3b como a C4b sucede a través de dos sitios distintos, cada uno compuesto de tres SCR, (revisado por (Krych-Goldberg y Atkinson, *Immunol Rev* 180, 112-122 (2001))). La estructura del sitio de unión a C3b, contenido dentro de SCR 15-17 de CR1 (sitio 2), se ha determinado por MRI (Smith et al., *Cell* 108, 769-780 (2002)), revelando que los tres módulos están en una disposición ampliada cabeza a cola con flexibilidad en la unión 16-17. La mutagénesis guiada por estructura identificó una región superficial cargada positivamente en el módulo 15 que es crítica para la unión a C4b. Este parche, junto con cadenas laterales básicas del módulo 16 expuesto en la misma cara de CR1, es necesario para la unión a C3b. La función principal de CR1, descrita por primera vez como un receptor de adherencia inmunitaria (Rothman et al., *J Immunol* 115, 1312-1315 (1975)), es capturar IC en eritrocitos para el transporte y eliminación por el hígado (Taylor et al., *Clin Immunol Immunopathol* 82, 49-59 (1997)). Existe un papel en la fagocitosis para CR1 en neutrófilos, pero no en macrófagos tisulares (Sengelov et al., *J Immunol* 153, 804-810 (1994)). Además de su papel en la eliminación de complejos inmunitarios, CR1 es un potente inhibidor de la activación de las rutas tanto clásica como alternativa a través de su interacción con las convertasas respectivas (Krych-Goldberg y Atkinson, 2001, *supra*; Krych-Goldberg et al., *J Biol Chem* 274, 31160-31168 (1999)). En ratones, CR1 y CR2 son dos productos del mismo gen formados por corte y empalme alternativo y están asociados principalmente a linfocitos B y células dendríticas foliculares y funcionan principalmente en la regulación de respuestas de células B (Molina et al., 1996). El equivalente funcional de ratón de CR1, Crry, inactiva las enzimas de la ruta clásica y alternativa y actúa como regulador intrínseco de la activación del complemento en lugar de como un receptor fagocítico (Molina et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3357-3361 (1992)).

CR2 (CD21) se une a iC3b y C3dg y es el receptor principal del complemento que potencia la inmunidad de células B (Carroll, *Nat Immunol* 5, 981-986 (2004); Weis et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 881-885 (1984)). La captación de antígeno recubierto con C3d por células B afines provoca una señal potenciada mediante el receptor de antígeno de células B. Por tanto, el co-acoplamiento del co-receptor CD21-CD19-CD81 con el receptor de antígenos de células B disminuye el umbral de activación de células B y proporciona una señal de supervivencia importante (Matsumoto et al., *J Exp Med* 173, 55-64 (1991)). El sitio de unión de CR2 en iC3b se ha mapeado parcialmente en la superficie de contacto entre los dominios TED y MG1 (Clemenza e Isenman, *J Immunol* 165, 3839-3848 (2000)).

CR3 y CR4 son heterodímeros transmembrana compuestos por una subunidad alfa (CD11b o α_M y CD11c o α_X , respectivamente) y una cadena beta común (CD18 o β_2), y están implicados en la adhesión a matriz extracelular y a otras células así como en el reconocimiento de iC3b. Pertenecen a la familia de integrina y realizan funciones no solamente en la fagocitosis, sino también en el tráfico y migración de leucocitos, formación de sinapsis y co-estimulación (revisado por (Ross, *Adv Immunol* 37, 217-267 (2000)). La adhesividad de la integrina está regulada a través de un proceso llamado señalización de dentro hacia fuera, que transforma las integrinas de un estado de unión de baja afinidad a alta afinidad (Liddington y Ginsberg, *J Cell Biol* 158, 833-839 (2002)). Además, la unión al ligando transduce señales desde el dominio extracelular al citoplasma. Los sitios de unión de iC3b se han mapeado a varios dominios en la cadena alfa de CR3 y CR4 (Diamond et al., *J Cell Biol* 120, 1031-1043 (1993); Li y Zhang, *J Biol Chem* 278, 34395-34402 (2003); Xiong y Zhang, *J Biol Chem* 278, 34395-34402 (2001)). Los múltiples ligandos para CR3: iC3b, beta-glucano e ICAM-1, parecen unirse a sitios parcialmente solapantes contenidos dentro del dominio I de CD11b (Balsam et al., 1998; Diamond et al., 1990; Zhang y Plow, 1996). Su reconocimiento específico de la forma proteolíticamente inactivada de C3b, iC3b, se predice basándose en estudios estructurales que localizan los sitios de unión de CR3 en restos que quedarán expuestos tras el desplegamiento del dominio CUB en C3b (Nishida et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19737-19742 (2006)), que sucede tras escisión de la cadena α' por la proteasa reguladora del complemento, Factor I

CR1g es un receptor asociado a macrófagos con homología al antígeno A33 y JAM1 que es necesario para la eliminación de patógenos del torrente sanguíneo. Una proteína CR1g humana se clonó por primera vez a partir de una biblioteca de ADNc fetal humano usando cebadores degenerados que reconocen dominios Ig conservados de JAM1 humano. La secuenciación de varios clones reveló una fase de lectura abierta de 400 aminoácidos. Búsquedas BLAST confirmaron similitud a Z39lg, una proteína transmembrana de tipo 1 (Langnaese et al., *Biochim Biophys Acta* 1492 (2000) 522-525). Se descubrió que la región extracelular de esta molécula consistía en dos

dominios tipo Ig, que comprenden un dominio V-set N-terminal y un dominio C2-set C-terminal. La novedosa proteína humana se denominó originalmente "single transmembrane Ig superfamily macrophage associated" asociada a macrófagos del miembro de la superfamilia de Ig transmembrana individual (huSTlgMA). Posteriormente, usando cebadores 3' y 5', se clonó una variante de corte y empalme de huSTlgMA, que carece el dominio IgC proximal de membrana y es 50 aminoácidos más corta. Por consiguiente, la variante de corte y empalme más corta de esta proteína humana se denominó huSTlgMAshort. La secuencia de aminoácidos de huSTlgMA (mencionada como PRO362) y la secuencia polinucleotídica codificante se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.410.708, expedida el 25 de junio de 2002. Además, tanto huSTlgMA como huSTlgMAshort, junto con la proteína STlgMA murina (muSTlgMA) y las secuencias de ácido nucleico, se describen en la publicación PCT WO 2004031105, expedida el 15 de abril de 2004.

La estructura cristalina de CRlg y un complejo C3b:CRlg se describe en la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2008/0045697, publicada el 21 de febrero de 2008. La estructura de este complejo también se describe en Wiesmann et al., *Nature*, 444(7116):217-20, 2006. Este artículo también describe el uso de mutantes de CRlg para proporcionar evidencias de que CRlg actúa como inhibidor de la ruta alternativa del complemento. Además, la publicación PCT WO 2008036135 se refiere al uso del CRlg y estructura del complejo C3b:CRlg para identificar moléculas que están estructural y funcionalmente relacionadas con CRlg.

Las células de Kupffer (KC), que residen dentro del lumen de los sinusoides del hígado, forman la población más grande de macrófagos en el cuerpo. Aunque las KC tienen marcadores en común con otros macrófagos residentes del tejido, realizan funciones especializadas dirigidas a una eliminación eficaz de las bacterias derivadas del intestino, desechos microbianos, endotoxinas bacterianas, complejos inmunitarios y células muertas presentes en la sangre de la vena porta que drena desde el sistema microvascular del tracto digestivo (Bilzer et al., *Liver Int* 26, 1175-1186 (2006)). La unión eficaz de patógenos a la superficie de las KC es una etapa crucial en la defensa inmunitaria de primera línea contra los patógenos (Benacerraf et al., *J Exp Med* 110, 27-48 (1959)). Un papel central para las KC en la eliminación rápida de patógenos de la circulación se ilustra por la mortalidad significativamente aumentada en ratones con reducción de KC (Hirakata et al., *Infect Immun* 59, 289-294 (1991)). La identificación de CRlg acentúa adicionalmente el papel crítico del complemento y las KC en la defensa inmunitaria de primera línea contra patógenos en circulación. El uso de CRlg en la prevención y tratamiento de trastornos asociados al complemento se ha descrito en la publicación PCT WO 2006042329.

Los únicos receptores de C3 del complemento identificados en KC de ratón son CRlg y CR3 (Helmy et al., *Cell* 124, 915-927 (2006)), aunque las KC humanas muestran expresión adicional de CR1 y CR4 (Hinglais et al., 1989). Tanto CRlg como CR3 en las KC contribuyen a la unión a partículas opsonizadas iC3b *in vitro* (Helmy et al., *Lab Invest* 61, 509-514 (2006)). *In vivo*, el papel de CR3 expresado en KC en la unión a patógenos recubiertos con iC3b está menos claro. Se ha propuesto que CR3 contribuye a la eliminación de patógenos de forma indirecta mediante el reclutamiento de neutrófilos y la interacción con ICAM1 expresada en neutrófilos (Conlan y North, *Exp Med* 179, 259-268 (1994); Ebe et al., *Pathol Int* 49, 519-532 (1999); Gregory et al., *J Immunol* 157, 2514-2520 (1996); Gregory y Wing, *J Leukoc Biol* 72, 239-248 (2002); Rogers y Unanue, *Infect Immun* 61, 5090-5096 (1993)). En contraste, CRlg realiza un papel directo capturando patógenos que transitan a través del lumen sinusoide del hígado (Helmy et al., 2006, *supra*). Una diferencia en la biología de CRlg frente a CR3 está en parte reflejada por la diferencia en las características de unión de estos dos receptores. CRlg expresado en KC se une de forma constitutiva a fragmentos C3 monoméricos mientras que CR3 se une solamente a partículas opsonizadas con iC3b (Helmy et al., 2006, *supra*). La capacidad de CRlg de capturar de forma eficaz C3b monomérico e iC3b así como partículas recubiertas con C3b/iC3b refleja la afección aumentada creada por una interacción multivalente entre moléculas CRlg centradas en la punta de extensiones de membrana de los macrófagos (Helmy et al., 2006, *supra*) y multímeros de C3b e iC3b presentes en la superficie del patógeno. Mientras CR3 se une solamente a partículas recubiertas con iC3b, CRlg se une adicionalmente a C3b, el primer producto de escisión de C3 formado en patógenos opsonizados en suero (Croize et al., *Infect Immun* 61, 5134-5139 (1993)). Como una gran cantidad de moléculas C3b unidas a la superficie del patógeno están protegidas de escisión por factor H e I (Gordon et al., *J Infect Dis* 157, 697-704 (1988)), el reconocimiento de ligandos C3b por CRlg asegura la rápida unión y eliminación. Por tanto, aunque se expresan tanto CRlg como CR3 en KC, muestran diferente especificidad de ligando, distintas propiedades de unión y distinta cinética de eliminación de patógeno.

Ejemplos de patógenos que explotan los receptores de superficie celular para la entrada celular son virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Yesenia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* y parásitos como el protozooide *Leishmania major* (Cossart y Sansonetti, *Science* 304:242-248 (2004); Galan, *Cell* 103:363-366 (2000); Hornef et al., *Nat. Immunol.* 3:1033-1040 (2002); Stoiber et al., *Mol. Immunol.* 42:153-160 (2005)).

Como se ha analizado anteriormente, CRlg es un receptor de C3 del complemento descubierto recientemente expresado en una subpoblación de macrófagos residentes en el tejido. Después de funcionar como un receptor del complemento para proteínas C3, el dominio IgV extracelular de CRlg inhibe selectivamente la ruta alternativa del complemento uniéndose a C3b e inhibiendo la activación proteolítica de C3 y C5. Sin embargo, la afinidad de unión de CRlg por la subunidad convertida C3b es baja (CI50 > 1 mM) que requiere una concentración relativamente alta de proteína para alcanzar la inhibición casi completa del complemento. Por consiguiente, existe una necesidad de

polipéptidos CRlg con eficacia terapéutica mejorada. La presente invención proporciona dichos polipéptidos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en la construcción de una variante de CRlg con afinidad de unión potenciada. Una proteína CRlg-ECD con sustituciones combinadas de aminoácidos Q64R y M86Y mostró una afinidad de unión aumentada 30 veces y una actividad inhibidora del complemento mejorada 7 veces con respecto a la variante de CRlg de tipo silvestre (WT). Además, el tratamiento con la proteína de fusión de CRlg de afinidad mejorada en un modelo de ratón de artritis produjo una reducción significativa en las puntuaciones clínicas en comparación con el tratamiento con una proteína CRlg de tipo silvestre.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a variantes de CRlg, todas como se define por las reivindicaciones. En un aspecto, la invención se refiere a una variante de CRlg que comprende una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 8, 14, 18, 42, 44, 45, 60, 64, 86, 99, 105, y 110 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que tiene una afinidad de unión al menos 2 veces aumentada a C3b con respecto a CRlg humana de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2 y/o que es un inhibidor al menos 2 veces más potente de la ruta alternativa del complemento que CRlg humano de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la variante se une selectivamente a C3b sobre C3, o un a fragmento del mismo.

En otra realización, la afinidad de unión se aumenta en al menos 3 veces, o en al menos 4 veces, o en al menos 5 veces, o en al menos 6 veces, o en al menos 7 veces, o en al menos 9 veces, o en al menos 10 veces, o en al menos 15 veces, o en al menos 20 veces, o en al menos 30 veces, o en al menos 40 veces, o en al menos 50 veces, o en al menos 70 veces, o en al menos 80 veces, o en al menos 90 veces, o en al menos 100 veces.

En una realización adicional, la variante comprende una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido 60, 64, 86, 99, 105 y 110 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En una realización adicional, la variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E8W, W14F, E8Y /W14F; P45F; G42D/D44H/P45F; Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; M86W, M86F, M86W/Q99R; M86F/Q99R; K110D, K110 N; Q105R/K110N; Q105R/K110Q; y Q105K/K110D.

En otra realización, la variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; Q60I/Q105R/K110N; M86Y/E8Y; M86Y/G42D/D44H/P45F; M86Y/P45F; M86Y/G42D/D44H/P45F; y M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N.

En otra realización más, la variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; Q99L; Q105K/K110D; E8W/Q105R/K110N; Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; M86Y/P45F; y M86Y/Q105K.

En una realización más específica, la variante comprende una sustitución Q60I/Q64R/M86Y o Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula quimérica que comprende una variante de CRlg como se define en este documento.

En una realización, la molécula quimérica es una inmunoadhesina.

En otra realización, la inmunoadhesina comprende una variante de CRlg que es más corta que CRlg de longitud completa de la SEQ ID NO: 2.

En otra realización más, la molécula quimérica comprende un dominio extracelular de CRlg.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante de CRlg o una molécula quimérica, por ejemplo, una inmunoadhesina de la presente invención, en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a la variante de CRlg, molécula quimérica o inmunoadhesina, para su uso en un método de tratamiento médico. En una realización, la variante, molécula quimérica o inmunoadhesina es para su uso en un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad o afección asociada al complemento.

En una realización, la enfermedad asociada al complemento es una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria.

En otra realización, la enfermedad asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, activación del complemento durante cirugía de derivación cardiopulmonar, dermatomiositis, pénfigo, nefritis por lupus y glomerulonefritis y vasculitis resultante, derivación cardiopulmonar, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejia, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, retinopatía diabética, alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de dificultad pulmonar oclusiva crónica (SDPC), asma, neumonía por aspiración, urticaria, urticaria idiopática crónica, síndrome urémico hemolítico, endometriosis, choque cardiogénico, lesión por isquemia-reperfusión y esclerosis múltiple (EM).

En otra realización más, la enfermedad asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna paroxísmica), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepato biliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas (por ejemplo, fibrosis quística), enteropatía sensible a gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas autoinmunitarias o mediadas por el sistema inmunitario incluyendo enfermedades cutáneas bullosas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante incluyendo rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Alzheimer, hemoglobinuria nocturna paroxísmica, angioedema hereditario, aterosclerosis y glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II.

En una realización preferida, la enfermedad asociada al complemento es artritis reumatoide (AR).

En otra realización preferida, la enfermedad asociada al complemento es una afección ocular asociada al complemento.

En una realización adicional, la afección ocular asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en todas las fases de degeneración macular relacionada con la edad (DME), uveítis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia, endoftalmitis y otras enfermedades neovasculares intraoculares.

En una realización adicional más, la enfermedad neovascular intraocular se selecciona del grupo que consiste en edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana central (OVR), neovascularización de la córnea y neovascularización de la retina.

En otra realización más, la afección ocular asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (DME), neovascularización coroidea (NVC), retinopatía diabética (RD) y endoftalmitis, donde DME incluye DME tanto húmeda como seca o atrófica.

En una realización, el paciente es un mamífero, preferiblemente un ser humano.

También se describe en este documento un método para la inhibición de la producción del fragmento del complemento C3b en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una variante de CRIg de la presente invención o una inmunoadhesina que comprenda dicha variante.

También se describe en este documento un método para la inhibición selectiva de la ruta alternativa del complemento en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una variante de CRIg de la presente invención o una inmunoadhesina que comprenda dicha variante.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la forma larga de longitud completa de 399 aminoácidos de CRIg humano nativo (huCRIg, SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente).

Las figuras 2A-2B muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la forma corta de 305 aminoácidos de CRIg humano nativo (huCRIg-short, SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente).

Las figuras 3A-3C muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de CRIg murino nativo de 280 aminoácidos (muCRIg, SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente).

Figura 4: Actividad de mutantes de CRIg en ensayo de unión y ensayo de inhibición. La afinidad de unión para CRIg se midió como desplazamiento competitivo de C3b (A) y la actividad biológica se midió por un ensayo de

inhibición de hemólisis. PUR10680 fue el control de tipo silvestre (rojo), RIL 41 (azul) y RL41 (verde) fueron dos mutantes (B). (C) Optimización por etapas de la superficie de contacto de unión de CRlg.

Figura 5: Correlación entre ELISA competitivo y ensayo hemolítico.

Figura 6: El mutante de CRlg Q64R/M86Y muestra afinidad de unión mejorada por análisis Biacore. (A) Sensogramas SPR generados por inyección de concentraciones crecientes de C3b sobre CRlg wt recubierto y proteínas CRlg Q64R M86Y. (B) El análisis en estado estable de los datos de unión indica una Kd de 0,2 micromolar para el mutante Q64R / M86Y y de 1,1 micromolar para CRlg de tipo silvestre.

Figura 7: CRlg de afinidad mejorada sigue siendo selectivo para C3b. Se utilizó ensayo competitivo Alpha Screen sobre C3 y C3b purificado.

Figura 8: Potencia inhibidora del complemento mejorada de CRlg Q64R M86Y en comparación con CRlg de tipo silvestre. (A) Se comparó la inhibición del complemento por CRlg de tipo silvestre y CRlg Q46R M86Y usando un ensayo hemolítico selectivo de la ruta alternativa usando glóbulos rojos de conejo y suero humano reducido en C1q. (B) Se comparó la inhibición del complemento por CRlg de tipo silvestre y CRlg Q46R M86Y usando un ensayo de la ruta alternativa basado en ELISA con LPS recubierto en placa de micropocillos y suero humano reducido en C1q.

Figura 9: CRlg Q64R M86Y muestra eficacia mejorada *in vivo* sobre CRlg WT.

(A) Puntuaciones clínicas de ratones a los que se ha inyectado suero KRN y se han tratado con diversas concentraciones y versiones de proteínas CRlg humanas y de ratón recombinantes de tipo silvestre y de afinidad madurada. Los datos representan la media de 4-7 ratones por grupo. (B) Diagramas de dispersión de puntuaciones clínicas de ratones individuales en el día 6 después de la transferencia de suero. (C) Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de ratones tratados con CRlg wt o CRlg Q64R M86Y 6 días después de la transferencia de suero. (D) Diagramas de dispersión de puntuaciones histológicas de ratones tratados con CRlg wt o CRlg Q64R M86Y 6 días después de la transferencia de suero.

Tabla 1: Bibliotecas de fagos. Se diseñaron cinco bibliotecas aleatorizadas de forma suave para cubrir el área de contacto entre CRlg y C3b.

Tabla 2: Generación por etapas de CRlg de mayor afinidad por presentación en fagos. Mutantes seleccionados de CRlg anti-C3b de las cinco bibliotecas aleatorizadas de forma suave. Cada panel muestra clones que se seleccionaron de cada biblioteca basándose en la afinidad de unión a C3b. La secuencia se indica por el código de aminoácidos de una letra. Cada panel compara los mutantes individuales con las secuencias consenso y de tipo silvestre (WT) precursora. Los restos están coloreados en consecuencia: azul - posición aleatorizada de forma suave; gris - no aleatorizado; amarillo - los restos seleccionados, que son diferentes de los del tipo silvestre (WT). La Tabla 2 describe las SEQ ID NO: 21-63 y 63-67, respectivamente, en orden de aparición.

Tabla 3: Comparación de afinidades de unión, determinadas por ELISA competitivo e inhibición de hemólisis *in vivo* para mutantes seleccionados. Los mutantes con una afinidad de unión o potencia *in vivo* más de 5 veces aumentada están sombreados en amarillo.

Tabla 4: Comparación de la afinidad de unión e inhibición de hemólisis *in vivo* para mutantes de segunda generación (secuencias precursoras mostradas en gris). Los mutantes con un aumento de más de 5 veces sobre el mutante precursor en la afinidad de unión están sombreados en azul, los mutantes con un aumento de más de 90 veces en la afinidad de unión están resaltados en amarillo. Asimismo, los mutantes con mayor potencia *in vivo* que las secuencias precursoras están resaltados en naranja.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Los términos "CRlg", "PRO362", "JAM4" y "STlgMA" se usan de forma intercambiable y se refieren a polipéptidos CRlg de secuencia nativa y variante.

Una CRlg de "secuencia nativa" es un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido CRlg obtenido de la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Por tanto, la CRlg de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "CRlg de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural de CRlg (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural de CRlg. Los polipéptidos CRlg de secuencia nativa incluyen específicamente el polipéptido CRlg humano de longitud completa de 399 aminoácidos de longitud de la SEQ ID NO: 2 (huCRlg, mostrado en las Figuras 1A y 1B), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de inicio en la posición 1 y con o sin alguno o todos del dominio transmembrana en las posiciones aproximadas de aminoácido 277 a 307 de la SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, el polipéptido CRlg de secuencia nativa es la forma corta de 305 aminoácidos de CRlg humana (huCRlg-short, SEQ ID NO: 4, mostrada en las Figuras 2A y 2B), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de inicio en la posición 1 y con o sin alguno o todos del dominio transmembrana en aproximadamente las posiciones 183 a 213 de la SEQ ID NO: 4. En una realización diferente, el polipéptido CRlg de secuencia nativa es un polipéptido CRlg murino de longitud completa, de 280 aminoácidos de longitud de la SEQ ID NO: 6 (muCRlg, mostrado en las Figuras 3A-3C), con o sin

una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de inicio en la posición 1 y con o sin alguno o todos del dominio transmembrana en aproximadamente las posiciones de aminoácido 181 a 211 de la SEQ ID NO: 6. Los polipéptidos CRlg de otros animales no humanos, incluyendo primates superiores y mamíferos, se incluyen específicamente dentro de esta definición.

El "dominio extracelular" o "ECD" de CRlg se refiere a una forma del polipéptido CRlg, que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático de las moléculas de longitud completa respectivas. Habitualmente, el ECD de CRlg tendrá menos del 1 % de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y, preferiblemente, tendrá menos del 0,5 % de dichos dominios. El ECD de CRlg puede comprender los restos de aminoácido 1 o aproximadamente 21 para X de la SEQ ID NO: 2, 4, o 6, donde X es cualquier aminoácido de aproximadamente 271 a 281 en la SEQ ID NO: 2, cualquier aminoácido de aproximadamente 178 a 186 en la SEQ ID NO: 4, y cualquier aminoácido de aproximadamente 176 a 184 en la SEQ ID NO: 6.

La expresión "variante de CRlg", como se usa en este documento, significa un polipéptido CRlg activo como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido CRlg de secuencia nativa incluyendo, sin limitación, huCRlg de longitud completa (SEQ ID NO: 2), huCRlg-short (SEQ ID NO: 4), y muCRlg (SEQ ID NO: 6), cada uno con o sin la metionina de inicio N-terminal, con o sin la secuencia señal N-terminal, con o sin todo o parte del dominio transmembrana y con o sin el dominio intracelular. En una realización particular, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente un 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de longitud completa maduro desde dentro de la secuencia de la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En otra realización, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente un 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de longitud completa maduro desde dentro de la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En otra realización más, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente un 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de longitud completa maduro desde dentro de la secuencia de la SEQ ID NO: 6. Habitualmente, una variante de CRlg tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos madura desde dentro de la SEQ ID NO: 2, 4, o 6. Durante toda la descripción, incluyendo los ejemplos, la expresión "tipo silvestre" o "WT (por las siglas en inglés *Wild Type*)" se refiere a la forma corta de longitud completa madura de CRlg humana (CRlg(S)) (SEQ ID NO: 4), y la numeración de los restos de aminoácido en las variantes de CRlg se refiere a la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

Las variantes de CRlg de la presente invención son agonistas de CRlg, como se define posteriormente en este documento. En particular, las variantes de CRlg en este documento mantienen la unión selectiva a C3b sobre C3, donde "unión selectiva" se usa para hacer referencia a la unión a C3b y una ausencia de unión a C3. Además, en una realización preferida, las variantes de CRlg de la presente invención tienen afinidad de unión aumentada a C3b respecto a un polipéptido CRlg de secuencia nativa, tal como la forma larga humana de CRlg (SEQ ID NO: 2). En diversas realizaciones, el aumento en la afinidad de unión es de al menos aproximadamente 2 veces, o al menos aproximadamente 3 veces, o al menos aproximadamente 4 veces, o al menos aproximadamente 5 veces, o al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces, o al menos aproximadamente 8 veces, o al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 15 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 25 veces, o al menos aproximadamente 30 veces, o al menos aproximadamente 35 veces, o al menos aproximadamente 40 veces, o al menos aproximadamente 45 veces, o al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 55 veces, o al menos aproximadamente 60 veces, o al menos aproximadamente 65 veces, o al menos aproximadamente 70 veces, o al menos aproximadamente 75 veces, o al menos aproximadamente 80 veces, o al menos aproximadamente 85 veces, o al menos aproximadamente 90 veces, o al menos aproximadamente 95 veces, o al menos aproximadamente 100 veces, respecto al polipéptido CRlg humano de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, el aumento en la afinidad de unión a C3b respecto al polipéptido CRlg humano de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2 es de aproximadamente 5-10 veces, o de aproximadamente 5-15 veces, o de aproximadamente 5-20 veces, o de aproximadamente 5-25 veces, o de aproximadamente 5-30 veces, o de aproximadamente 5-35 veces, o de aproximadamente 5-40 veces, o de aproximadamente 5-45 veces, o de aproximadamente 5-50 veces, o de aproximadamente 5-55 veces, o de aproximadamente 5-60 veces, o de aproximadamente 5-65 veces, o de aproximadamente 5-70 veces, o de aproximadamente 5-75 veces, o de aproximadamente 5-80 veces, o de aproximadamente 5-85 veces, o de aproximadamente 5-90 veces, o de aproximadamente 5-95 veces, o de aproximadamente 5-100 veces.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las variantes de CRlg en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia variante de CRlg que son idénticos con los restos de aminoácido en la secuencia de CRlg nativa con la que se comparan, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Para secuencia que difieren en longitud, el porcentaje de identidad de secuencia se determina respecto a la secuencia más larga, a lo largo de la longitud completa de las secuencias más largas. La alineación con fines de determinación

del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversos modos que están dentro de las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la

- 5 alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. La identidad de secuencia después se calcula respecto a la secuencia más larga, es decir, incluso si una secuencia más corta muestra un 100 % de identidad de secuencia con una parte de una secuencia más larga, la identidad de secuencia global será menor del 100 %.
- 10 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias que codifican la variante de CRIg identificadas en este documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos los nucleótidos en la secuencia codificante de la variante de CRIg, respectivamente,
- 15 después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico puede conseguirse de diversos modos que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. La identidad de secuencia entonces se calcula respecto a la secuencia más larga, es decir,
- 20 incluso si una secuencia más corta muestra un 100 % de identidad de secuencia con una parte de una secuencia más larga, la identidad de secuencia global será menor del 100 %.

Se incluyen en la definición de una variante de CRIg todas las variantes de secuencia de aminoácidos, como se ha definido anteriormente en este documento, independientemente de su modo de identificación o preparación. Se

- 25 incluyen específicamente en este documento variantes que se han modificado por sustitución, químicamente, enzimáticamente o por otros medios apropiados con un resto diferente a un aminoácido de origen natural, siempre que retengan una propiedad biológica cualitativa de una CRIg de secuencia nativa. Las sustituciones de aminoácidos de origen no natural a modo de ejemplo incluyen las descritas a continuación en este documento.

- 30 Los restos de aminoácidos se clasifican en cuatro grupos principales:

Ácidos: El resto tiene una carga negativa debido a pérdida de iones H a pH fisiológico y el resto se ve atraído por la solución acuosa de modo que busca las posiciones superficiales en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en solución acuosa.

- 35 Básicos: El resto tiene una carga positiva debido a asociación con iones H a pH fisiológico y el resto se ve atraído por la solución acuosa de modo que busca las posiciones superficiales en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en un medio acuoso a pH fisiológico.

Neutros/no polares: Los restos no están cargados a pH fisiológico y el resto se ve repelido por la solución acuosa de modo que busca las posiciones interiores en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en un medio acuoso. Estos restos también se denominan "restos hidrófobos".

- 40 Neutros/polares: Los restos no están cargados a pH fisiológico, pero el resto se ve atraído por la solución acuosa de modo que busca las posiciones exteriores en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso.

- 45 Los restos de aminoácido pueden clasificarse adicionalmente como cíclicos o no cíclicos, aromáticos o no aromáticos con respecto a sus grupos de cadena lateral, siendo estas denominaciones habituales para los expertos en la materia.

Los aminoácidos habitualmente encontrados que no están codificados por el código genético, incluyen ácido 2-aminoadipico (Aad) para Glu y Asp; ácido 2-aminopimélico (Apm) para Glu y Asp; ácido 2-aminobutírico (Abu) para Met, Leu, y otros aminoácidos alifáticos; ácido 2-aminoheptanoico (Ahe) para Met, Leu y otros aminoácidos alifáticos; ácido 2-aminoisobutírico (Aib) para Gly; ciclohexilalanina (Cha) para Val, y Leu e Ile; homoarginina (Har) para Arg y Lys; ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr) para Lys, Arg y His; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, y Ala; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, y Ala; N-etilasparagina (EtAsn) para Asn, y Gln; hidroxil-lisina (Hyl) para Lys; alohidroxil-lisina (AHyl) para Lys; 3-(y 4)hidroxiprolina (3Hyp, 4Hyp) para Pro, Ser, y Thr; alo-isoleucina (Alle) para Ile, Leu, y Val; .rho.-amidinofenilalanina para Ala; N-metilglicina (MeGly, sarcosina) para Gly, Pro, y Ala; N-metilisoleucina (Melle) para Ile; norvalina (Nva) para Met y otros aminoácidos alifáticos; norleucina (Nle) para Met y otros aminoácidos alifáticos; ornitina (Orn) para Lys, Arg y His; citrulina (Cit) y sulfóxido de metionina (MSO) para Thr, Asn y Gln; N-metilfenilalanina (MePhe), trimetilfenilalanina, halo (F, Cl, Br, y I)fenilalanina, trifluorilfenilalanina, para Phe.

- Como se usa en este documento, el término "inmunoadhesina" denomina moléculas tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente al sitio de reconocimiento y de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.

La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

"Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, así como aquellos en que el trastorno tiene que prevenirse.

"Mejorar" como se usa en este documento, se define en este documento como desarrollar mejoras o mejorar.

El término "mamífero" como se usa en este documento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos, primates no humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de competición o de compañía tales como caballos, cerdos, ganado vacuno, perros, gatos y hurones, etc. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un primate superior, mucho más preferiblemente un ser humano.

La expresión "enfermedad asociada al complemento" se usa en este documento en el sentido más amplio e incluye todas las enfermedades y afecciones patológicas cuya patogénesis implica anomalías de la activación del sistema del complemento, tales como, por ejemplo, deficiencias del complemento. La expresión incluye específicamente enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición de la C3 convertasa. La expresión incluye adicionalmente enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición, incluyendo inhibición selectiva, de la ruta alternativa del complemento. Las enfermedades asociadas al complemento incluyen, sin limitación, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperfusión, activación del complemento durante cirugía de derivación cardiopulmonar, dermatomiositis, pénfigo, nefritis por lupus y glomerulonefritis y vasculitis resultante, derivación cardiopulmonar, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejía, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, retinopatía diabética, alo-trasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de dificultad pulmonar oclusiva crónica (SDPC), asma y neumonía por aspiración. En una realización preferida, la "enfermedad asociada al complemento" es una enfermedad en que la ruta alternativa del complemento desempeña un papel prominente, incluyendo artritis reumatoide (AR), afecciones oculares asociadas al complemento, tales como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome antifosfolípido, lesión intestinal y renal por isquemia-reperfusión y glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II.

La expresión "afección ocular asociada al complemento" se usa en este documento en el sentido más amplio e incluye todas las afecciones y enfermedades oculares cuya patología implica al complemento, incluyendo las rutas clásica y alternativa, y en particular la ruta alternativa del complemento. Se incluyen específicamente dentro de este grupo todas las afecciones y enfermedades oculares asociadas a la ruta alternativa cuya aparición, desarrollo o progresión puede controlarse por la inhibición de la ruta alternativa. Las afecciones oculares asociadas al complemento incluyen, sin limitación, enfermedades degenerativas maculares, tales como todas las fases de degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo las formas seca y húmeda (no exudativa y exudativa), neovascularización coroidea (NVC), uveítis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia, endoftalmitis y otras enfermedades neovasculares intraoculares, tales como edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana central (OVR), neovascularización de la córnea y neovascularización de la retina. Un grupo preferido de afecciones oculares asociadas al complemento incluye degeneración macular relacionada con la edad (DME), incluyendo DME no exudativa (húmeda) y exudativa (seca o atrófica), neovascularización coroidea (NVC), retinopatía diabética (RD) y endoftalmitis.

La expresión "enfermedad inflamatoria" y "trastorno inflamatorio" se usan de forma intercambiable y significan una enfermedad o trastorno en que un componente del sistema inmunitario de un mamífero causa, media o contribuye de otro modo a una respuesta inflamatoria que contribuye a la morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en que la reducción de la respuesta inflamatoria tiene un efecto de mejora sobre la progresión de la enfermedad. Se incluyen dentro de esta expresión enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo enfermedades autoinmunitarias.

La expresión enfermedad "mediada por células T" significa una enfermedad en que las células T median de forma directa o indirecta o contribuyen de otro modo a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede estar asociada a efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc. e incluso efectos asociados a células T si las células T se estimulan, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por células T.

Ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por células T, incluyen, sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), lupus sistémico

eritematoso, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna paroxísmica), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas (por ejemplo, fibrosis quística), enteropatía sensible a gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades autoinmunitarias de la piel o mediadas por el sistema inmunitario incluyendo enfermedades cutáneas bullosas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante incluyendo rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Alzheimer y aterosclerosis.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

"Activo" o "actividad" en el contexto de variantes de los polipéptidos CRIg de la invención se refiere a una o más formas de dichos polipéptidos que retienen las actividades biológicas y/o inmunológicas de un polipéptido nativo o de origen natural de la invención. Una actividad biológica preferida es la capacidad de unirse a C3b y/o de afectar al complemento o a la activación del complemento, en particular de inhibir la ruta alternativa del complemento y/o la C3 convertasa. La inhibición de la C3 convertasa puede medirse, por ejemplo, midiendo la inhibición del recambio de C3 en suero normal durante artritis inducida por colágeno o anticuerpos, o la inhibición de la deposición de C3 en articulaciones artríticas.

"Actividad biológica" en el contexto de un polipéptido que imita la actividad biológica de CRIg se refiere, en parte, a la capacidad de dichas moléculas de unirse a C3b y/o de afectar al complemento o a la activación del complemento, en particular, de inhibir la ruta alternativa del complemento y/o la C3 convertasa.

El término "agonista" de CRIg se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica cualitativa (como se ha definido anteriormente en este documento) de un polipéptido CRIg de secuencia nativa.

"Unido de forma funcional" se refiere a la yuxtaposición de modo que pueda realizarse la función normal de los componentes. Por tanto, una secuencia codificante "unida de forma funcional" a secuencias de control se refiere a una configuración donde la secuencia codificante puede expresarse bajo el control de estas secuencias y donde las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o líder de secreción está unido de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma funcional a una secuencia codificante si está posicionado de modo que facilite la traducción. La unión se consigue por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, entonces se usan adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

"Secuencias de control" se refieren a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma funcional en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

"Sistema de expresión" se refiere a secuencias de ADN que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en unión funcional, de modo que los hospedadores transformados con estas secuencias sean capaces de producir las proteínas codificadas. Para lograr la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante después puede también integrarse en el cromosoma del hospedador.

Como se usa en este documento, "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas denominaciones incluyen descendencia. Por tanto, "transformantes" o "células transformadas" incluye la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente de la cantidad de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica de forma precisa en el contenido de ADN porque pueden suceder mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma funcionalidad que la cribada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden denominaciones distintas, estará claro a partir del contexto.

Los "plásmidos" se denominan por una "p" en minúscula precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida en este documento están disponibles en el mercado, están disponibles al público en una base no restringida o pueden construirse a partir de dichos plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, se conocen otros plásmidos equivalentes en la técnica y serán evidentes para los expertos en la materia.

Una "biblioteca de presentación en fagos" es una biblioteca de expresión de proteínas que expresa una colección de secuencias proteicas clonadas como fusiones con una proteína de envuelta de fago. Por tanto, la expresión "biblioteca de presentación en fagos" se refiere en este documento a una colección de fagos (por ejemplo, fagos filamentosos) donde el fago expresa una proteína externa (normalmente heteróloga). La proteína externa está libre de interacciones con (unión a) otros restos con los que se pone en contacto el fago. Cada fago que presenta una proteína externa es un "miembro" de la biblioteca de presentación en fagos.

La expresión "fago filamentosos" se refiere a una partícula vírica capaz de presentar un polipéptido heterogéneo sobre su superficie e incluye, sin limitación, fl, fd, Pfl, y M13. El fago filamentosos puede contener un marcador de selección tal como tetraciclina (por ejemplo, "fd-tet"). Son bien conocidos diversos sistemas de presentación en fagos filamentosos para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Zacher et al., Gene, 9:127-140 (1980), Smith et al., Science, 228:1315-1317 (1985); y Parmley y Smith, Gene, 73:305-318 (1988)).

El término "panning" se usa para hacer referencia a múltiples rondas del proceso de cribado en la identificación y aislamiento de fagos que portan compuestos, tales como anticuerpos, con alta afinidad y especificidad a una diana.

La expresión "restos conservados de aminoácido" se usa para hacer referencia a restos de aminoácido que son idénticos entre dos o más secuencias de aminoácidos alineadas entre sí.

II. Descripción detallada

El complemento es un componente importante de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, aunque los productos de división del complemento generados a través de la activación de cada una de las tres rutas del complemento (clásica, alternativa o de lectina) pueden causar inflamación y destrucción tisular. Por tanto, la activación incontrolada del complemento debido a la ausencia de regulación apropiada del complemento se ha asociado a diversas enfermedades inflamatorias crónicas. Lo dominante en esta cascada inflamatoria es los productos de división del complemento C3a y C5a que funcionan como quimioatrayentes y activadores de neutrófilos y macrófagos inflamatorios mediante los receptores de C3a y C5a (Mollnes, T.E., W.C. Song, y J.D. Lambris. 2002. Complement in inflammatory tissue damage and disease. Trends Immunol. 23:61-64).

CRlg es un receptor del complemento recién descubierto, que se expresa en una subpoblación de macrófagos residentes tisulares. Como receptor funcional, el dominio IgV extracelular de CRlg es un inhibidor selectivo de la ruta alternativa del complemento (Wiesmann et al., Nature, 444(7116):217-20, 2006). Una forma soluble de CRlg ha demostrado revertir la inflamación y la pérdida de hueso en modelos experimentales de artritis inhibiendo la ruta alternativa del complemento en la articulación. También se ha demostrado que la ruta alternativa del complemento no solamente es necesaria para la inducción de la enfermedad, sino también para la progresión de la enfermedad. Por tanto, la inhibición de la ruta alternativa por CRlg constituye una opción terapéutica prometedora para la prevención y tratamiento de enfermedades y trastornos cuya patogénesis implica la ruta alternativa del complemento. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Helmy et al., Cell, 125(1):29-32 (2006) y Katschke et al., J. Exp Med 204(6):1319-1325 (2007).

Sin embargo, la afinidad de CRlg por la subunidad de convertasa C3b es baja (intervalo micromolar). Para generar un inhibidor más potente para desarrollar un reactivo terapéutico, se usó la estructura cristalina de CRlg en complejo con C3b como guía y se empleó la tecnología de presentación en fagos para generar variantes de CRlg con afinidad de unión mejorada por C3b.

Por tanto, la presente invención se refiere a variantes de CRlg con propiedades mejoradas, tales como afinidad de unión mejorada por C3b y eficacia inhibidora potenciada.

Identificación de variantes de CRlg de afinidad madurada

Como se describe en mayor detalle en el ejemplo, la presentación en fagos de bibliotecas de proteínas o péptidos ofrece una metodología útil para la selección de variantes de CRlg con afinidad de unión mejorada por C3b y/u otras propiedades mejoradas, tales como actividad biológica potenciada (Smith, G. P., (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2:668-673). Las proteínas de alta afinidad, presentadas de un modo monovalente como fusiones con la proteína de envuelta del gen III de M13 (Clackson, T., (1994) et al., Trends Biotechnol. 12:173-183), pueden identificarse por clonación y secuenciación del ADN correspondiente empaquetado en las partículas de fagómido después de varias rondas de selección de unión.

La maduración de afinidad usando presentación en fagos se ha descrito, por ejemplo, en Lowman et al., Biochemistry 30(45): 10832-10838 (1991), véase también Hawkins et al, J. Mol Biol.254: 889-896 (1992), y en el Ejemplo a continuación. Aunque sin limitarse estrictamente a la siguiente descripción, este proceso puede describirse en resumen como: varios sitios dentro de la región predeterminada se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácido en cada sitio. Los mutantes de anticuerpo así generados se presentan de un modo monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetadas con cada partícula. El fago que expresa los diversos mutantes puede ciclarse a través de rondas de selección de unión, seguido por aislamiento y secuenciación de aquellos mutantes que presentan alta afinidad. El método también se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.750.373, expedida el 12 de mayo de 1998.

Un procedimiento modificado que implica presentación de afinidad combinada se describe en Cunningham, B. C. et al, EMBO J. 13(11), 2508-2515 (1994). El método proporciona un método para seleccionar novedosos polipéptidos de unión, que comprende: a) construir un vector de expresión replicable que comprende un primer gen que codifica un polipéptido, un segundo gen que codifica al menos una parte de una proteína de envuelta de fago natural o de tipo silvestre donde el primer y segundo gen son heterólogos, y un elemento regulador de la transcripción unido de forma funcional al primer y segundo gen, formando de ese modo una fusión génica que codifica una proteína de fusión; b) mutar el vector en una o más posiciones seleccionadas dentro del primer gen formando de ese modo una familia de plásmidos relacionados; c) transformar células hospedadoras adecuadas con los plásmidos; d) infectar las células hospedadoras transformadas con un fago auxiliar que tiene un gen que codifica la proteína de envuelta del fago; e) cultivar las células hospedadoras infectadas transformadas en condiciones adecuadas para formar partículas de fagómido recombinantes que contienen al menos una parte del plásmido y que son capaces de transformar el hospedador, con las condiciones ajustadas de modo que no más de una cantidad minoritaria de partículas de fagómido presenten no más de una copia de la proteína de fusión sobre la superficie de la partícula; f) poner en contacto las partículas de fagómido con una molécula diana de modo que al menos una parte de las partículas de fagómidos se una a la molécula diana; y g) separar las partículas de fagómido que se unen de aquellas que no. Preferiblemente, el método comprende adicionalmente transformar células hospedadoras adecuadas con partículas de fagómido recombinantes que se unen a la molécula diana y repetir las etapas d) a g) una o más veces.

Se indica que, aunque las variantes de CRIg de la presente invención se han identificado usando presentación en fagos, también pueden usarse otras técnicas y otras técnicas de presentación para identificar variantes de CRIg con propiedades mejoradas, incluyendo variantes CRIg de afinidad madurada.

Las variantes de CRIg de afinidad madurada de la presente invención se diseñaron para cubrir el área de contacto entre CRIg y C3b, que se identificó usando la estructura cristalina de una CRIg y un complejo C3b:CRIg descrito en la publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20080045697. En particular, como se muestra en la Tabla 1, las bibliotecas 1-5 se diseñaron para cubrir los restos E8-K15, R41-T47, S54-Q64, E85-Q99, y Q105-K111, respectivamente, de la molécula CRIg de longitud completa de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2.

En una realización, las variantes de CRIg de este documento contienen una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 8, 14, 18, 42, 44, 45, 60, 64, 86, 99, 105, y 110 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Las variantes de CRIg representativas de este documento se exponen en la Tabla 3.

Preferiblemente, la sustitución está en una o más de las posiciones de aminoácido 60, 64, 86, 99, 105 y 110 de la secuencia de aminoácidos de CRIg nativa de longitud completa de la SEQ ID NO: 2.

Sin limitación, las variantes de CRIg de afinidad madurada incluyen específicamente una o más de las siguientes sustituciones dentro de la SEQ ID NO: 2: E8W, W14F, E8Y /W14F; P45F; G42D/D44H/P45F; Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; M86W, M86F, M86W/Q99R; M86F/Q99R; K110D, K110N; Q105R/K110N; Q105R/K110Q; Q105K/K110D.

Se muestran variantes adicionales de CRIg de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2 con dos o más sustituciones de aminoácido en la Tabla 3. Se incluyen específicamente dentro de este grupo Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; Q60I/Q105R/K110N; M86Y/E8Y; M86Y/G42D/D44H/P45F; M86Y/P45F; M86Y/G42D/D44H/P45F; M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N.

Las variantes de CRIg preferidas de este documento comprenden una mutación seleccionada del grupo que consiste en: Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; Q99L; Q105K/K110D; E8W/Q105R/K110N; Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; M86Y/P45F; M86Y/Q105K.

Las variantes particularmente preferidas comprenden las mutaciones Q60I/Q64R/M86Y o Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F.

Las variantes que contienen una o más de las mutaciones enumeradas anteriormente o en las Tablas 3 y 4 pero que por lo demás retienen la secuencia de CRIg nativa de la SEQ ID NO: 2 se incluyen específicamente en este documento. Dichas variantes se denominarán en este documento enumerando la mutación particular seguida por "CRIg". Por tanto, por ejemplo, una variante que difiere de CRIg de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2 solamente por la mutación E8W se denominará como "E8W CRIg", una variante que difiere de CRIg de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2 solamente por las mutaciones Q60I/Q64R/M86Y se denominará como "Q60I/Q64R/M86Y CRIg," etc.

Preparación de variantes de CRIg

Están disponibles diversas técnicas que pueden emplearse para producir ADN, que puede codificar proteínas para la síntesis recombinante de las variantes de CRIg de la invención. Por ejemplo, es posible obtener ADN basado en secuencias de ADN de origen natural que codifican cambios en una secuencia de aminoácidos de la proteína resultante. Este ADN mutante puede usarse para obtener las variantes de CRIg de la presente invención. Estas técnicas contemplan, de forma simplificada, obtener un gen que codifica un polipéptido CRIg nativo, modificar los genes por técnicas recombinantes tales como las analizadas a continuación, insertar los genes en un vector de expresión apropiado, insertar el vector en una célula hospedadora apropiada, cultivar la célula hospedadora para causar la expresión de la variante de CRIg deseada y purificar la molécula producida por la misma.

Algo más particularmente, una secuencia de ADN que codifica una variante de CRIg de la presente invención se obtiene por construcción sintética de la secuencia de ADN como se describe en libros de texto convencionales, tales como, por ejemplo, Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning* (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989).

a. Mutagénesis mediada por oligonucleótido

La mutagénesis mediada por oligonucleótido es el método preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de un polipéptido CRIg nativo o de un fragmento del mismo. Esta técnica es bien conocida en la técnica como se describe por Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 10: 6487-6504 (1987). En resumen, el ácido nucleico que codifica la secuencia polipeptídica de partida se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con un molde de ADN, donde el molde es la forma monocatenaria del plásmido que contiene la secuencia de ADN inalterada o nativa de ácido nucleico codificante. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que por tanto incorporará el cebador oligonucleotídico y codificará la alteración seleccionada del ácido nucleico de partida.

Generalmente, se usan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios al molde en cada lado del nucleótido o nucleótidos que codifican la mutación. Esto asegura que el oligonucleótido hibridará apropiadamente con la molécula molde de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas por Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5765 (1978).

Si se usa presentación en fagos, el molde de ADN solamente puede generarse por aquellos vectores que se obtienen de vectores del bacteriófago M13 (son adecuados los vectores M13mp18 y M13mp19 habitualmente disponibles) o aquellos vectores que contienen un origen de replicación del fago monocatenario como se describe por Viera et al., *Meth. Enzymol.* 153: 3 (1987). Por tanto, el ADN que tiene que mutarse debe insertarse en uno de estos vectores para generar un molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en las secciones 4.21-4.41 de Sambrook et al., *supra*.

Para alterar la secuencia de ADN nativa, el oligonucleótido se hibrida al molde monocatenario en condiciones adecuadas de hibridación. Después se añade una enzima de polimerización de ADN, habitualmente el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I para sintetizar la hebra complementaria del molde usando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Por tanto, se forma una molécula heterodúplex de modo que una hebra del ADN codifica la forma mutada de CRIg y la otra hebra (el molde original) codifica la secuencia nativa e inalterada de CRIg. Esta molécula heterodúplex después se transforma en una célula hospedadora adecuada, habitualmente un procarionta tal como *E. coli* JM-101. Después de cultivar las células, se siembran en placas de agarosa y se exploran usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con ³²fosfato para identificar las colonias bacterianas que contiene el ADN mutado.

El método descrito justo anteriormente puede modificarse de modo que se cree una molécula homodúplex donde ambas hebras del plásmido contienen la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP), y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(aS) (Amersham). Esta mezcla se añade al complejo de molde-oligonucleótido. Tras la adición de la ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una hebra de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva hebra de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión con endonucleasa de restricción. Después la hebra molde del heterodúplex bicatenario se mella con una enzima de restricción apropiada, la hebra molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio o sitios a mutagenizar.

La reacción después se detiene para dejar una molécula que es solamente monocatenaria parcialmente. Después se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex después puede transformarse en una célula hospedadora adecuada tal como *E. coli* JM101, como se ha descrito anteriormente.

Pueden generarse mutantes con más de un aminoácido a sustituir en una de varias formas. Si los aminoácidos están localizados cerca juntos en la cadena polipeptídica, puede mutarse simultáneamente usando un oligonucleótido que codifique todas las sustituciones deseadas de aminoácido. Si, sin embargo, los aminoácidos están localizados alguna distancia entre sí (separados por más de aproximadamente diez aminoácidos) es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, pueden emplearse uno o dos métodos alternativos.

En el primer método, se genera un oligonucleótido diferente para cada aminoácido a sustituir. Los oligonucleótidos después se hibridan con ADN molde monocatenario simultáneamente y la segunda hebra de ADN que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones de aminoácido deseadas. El método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es como se describe para los mutantes individuales: se usa ADN de tipo silvestre para el molde y el oligonucleótido que codifica la primera sustitución o sustituciones de aminoácido deseadas se hibrida con este molde, y después se genera la molécula de ADN heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como molde. Por tanto, este molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la sustitución o sustituciones de aminoácido deseadas adicionales después se hibrida con este molde, y la hebra resultante de ADN ahora codifica mutaciones tanto de la primera como de la segunda ronda de mutagénesis. Este ADN resultante puede usarse como molde en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente.

b. Mutagénesis con casete

Este método es también un método preferido para preparar variantes de sustitución, delección e inserción de CRIg. El método se basa en el descrito por Wells et al. Gene 34: 315 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el gen 1, el gen a mutar. Se identifica el codón o codones a mutar en el ácido nucleico que codifica la molécula CRIg de partida. Debe haber un sitio de endonucleasa de restricción único en cada lado del sitio o sitios de mutación identificados. Si no existen dichos sitios de restricción, pueden generarse usando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótido descrito anteriormente para introducirlos en localizaciones apropiadas en el gen 1. Después de haber introducido los sitios de restricción en el plásmido, el plásmido se corta en estos sitios para linealizarlo. Se sintetiza un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la mutación o mutaciones deseadas usando procedimientos convencionales. Las dos hebras se sintetizan por separado y después se hibridan juntas usando técnicas convencionales. Este oligonucleótido bicatenario se menciona como casete. Este casete se diseña para que tenga extremos 3' y 5' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de modo que pueda ligarse directamente al plásmido. Este plásmido ahora contiene la secuencia de ADN mutada de CRIg.

c. Producción recombinante de variantes de CRIg

El ADN que codifica variantes después se inserta en un plásmido o vector apropiado. El vector se usa para transformar una célula hospedadora. En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y control que se obtienen de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con aquellos hospedadores. El vector habitualmente porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas.

Por ejemplo, puede transformarse *E. coli* usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Mandel, M. et al., (1970) J. Mol. Biol. 53:154). El plásmido pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina, y por tanto proporciona un medio fácil para la selección. Otros vectores incluyen diferentes características tales como diferentes promotores, que a menudo son importantes en la expresión. Por ejemplo, los plásmidos pKK223-3, pDR720 y pPL-X representan vectores de expresión con los promotores tac, trp, o PL que están actualmente disponibles (Pharmacia Biotechnology).

Otros vectores preferidos pueden construirse usando técnicas convencionales combinando los rasgos relevantes de los vectores descritos en este documento. Los rasgos relevantes del vector incluyen el promotor, el sitio de unión al ribosoma, el gen variante o fusión génica, la secuencia señal, los marcadores de resistencia a antibiótico, el número de copias y los orígenes apropiados de replicación.

Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de este documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de

abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados de clonación o expresión para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común del cervicero, es la más habitualmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están habitualmente disponibles y son útiles en este documento otros varios géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedadores *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Está disponible al público diversas cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse en la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden utilizarse como hospedadores.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de las variantes de CRIg de este documento y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras usadas para producir las variantes de CRIg de esta invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM) (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado por Dulbecco Medium ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos n.º Re 30.985 pueden usarse como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según lo necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente equivalente de energía. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de CRIg puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si la variante de CRIg se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los desechos particulados, las células hospedadoras o células lisadas, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando la variante de CRIg se secreta en el medio, los sobrenadantes procedentes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponibles en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede

incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La variante de CRlg preparada a partir de las células puede purificarse por técnicas conocidas usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad.

Modificaciones adicionales de las variantes de CRlg

Las variantes de CRlg de la presente invención también pueden modificarse en un modo para formar una molécula quimérica que comprende la variante de CRlg, incluyendo fragmentos de la misma, fusionada a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de la variante de CRlg o un fragmento de la misma, con un polipéptido de marca que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-marca. La marca epitópica se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido CRlg variante. La presencia de dichas formas marcadas con epítipo de la variante de CRlg puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de marca. Además, proporcionar la marca epitópica posibilita que el polipéptido CRlg se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la marca epitópica. Son bien conocidos en la técnica diversos polipéptidos de marca y sus anticuerpos respectivos. Ejemplos incluyen marcas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de marca flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); y la marca de glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)). Otros polipéptidos de marca incluyen el péptido-Flag (Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)); el péptido de epítipo KT3 (Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)); un péptido epitópico de .cuadratura.-tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y la marca del péptido proteico del gen 10 de T7 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)).

En otra realización, la molécula quimérica puede comprender una fusión de la variante de CRlg o un fragmento de la misma con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula IgG. Estos polipéptidos de fusión son moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina, y a menudo se mencionan como inmuno adhesinas. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente del sitio de reconocimiento y unión de antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

El diseño de inmuno adhesina más simple y más directo combina la región o regiones de unión de la proteína "adhesina" con las regiones de Bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Habitualmente, cuando se preparan las quimeras de CRlg-inmunoglobulina de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de CRlg se fusionará de forma C-terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, también son posibles fusiones N-terminales.

Típicamente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos los dominios de bisagra y CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se hacen al extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminales al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; son bien conocidos sitios particulares y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de las quimeras de CRlg-inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, las quimeras de CRlg-inmunoglobulina se ensamblan como monómeros, o hetero u homomultímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros, esencialmente como se ilustra en el documento WO 91/08298.

En una realización preferida, la secuencia del dominio extracelular de CRlg se fusiona al extremo N-terminal de la parte C-terminal de un anticuerpo (en particular el dominio Fc), que contiene las funciones efectoras de una inmunoglobulina, por ejemplo, inmunoglobulina G.sub.1 (IgG 1). Es posible fusionar la región constante de cadena pesada completa a la secuencia de dominio extracelular de CRlg. Sin embargo, más preferiblemente, se usa una secuencia que empieza en la región de bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión con papaína (que define Fc de IgG químicamente; resto 216, tomando el primer resto de la región constata de cadena pesada en 114, o sitios análogos de otras inmunoglobulinas) en la fusión. En una realización particularmente preferida, la secuencia de

aminoácidos de CRIg se fusiona a la región de bisagra y a CH2 y CH3, o a los dominios CH1, de bisagra, CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG3. El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico, y el sitio óptimo puede determinarse por experimentación rutinaria.

En algunas realizaciones, las quimeras de CRIg-inmunoglobulina se ensamblan como multímeros, y particularmente como homodímeros u homotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural de cuatro cadenas básica es la forma en que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; IgM generalmente existe como un pentámero de unidades de cuatro básicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso de multímeros, cada unidad de cuatro puede ser igual o diferente.

Como alternativa, la secuencia del dominio extracelular de CRIg puede insertarse entre las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera de inmunoglobulina de modo que se obtenga una inmunoglobulina que comprenda una cadena pesada quimérica. En esta realización, la secuencia de CRIg se fusiona al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, entre el dominio de bisagra y CH2, o entre los dominios CH2 y CH3. Se ha informado de construcciones similares por Hoogenboom et al., Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991).

Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es necesaria en las inmuno adhesinas de la presente invención, podría estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina asociada de forma covalente a un polipéptido de fusión de CRIg-cadena pesada de inmunoglobulina o fusionada directamente al dominio extracelular de CRIg. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina normalmente se co-exprende con el ADN que codifica la proteína de fusión de CRIg-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidas por disulfuro. Los métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 expedida el 28 de marzo de 1989.

Composiciones farmacéuticas

Las variantes de CRIg de la presente invención pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades cuya patología implica la ruta alternativa del complemento.

Las formulaciones terapéuticas se preparan para almacenamiento mezclando la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con vehículos opcionales farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra iones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el polipéptido, anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]).

La formulación de este documento también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Las moléculas activas también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y en

macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas estériles de filtración.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y .gamma.etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, provocando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces intermoleculares S-S a través de intercambio de tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

Métodos de tratamiento

Como resultado de su capacidad de inhibir la activación del complemento, en particular la ruta alternativa del complemento, las variantes de CRlg de la presente invención encuentran utilidad en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y afecciones patológicas asociadas al complemento. Dichas enfermedades y afecciones incluyen, sin limitación, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias asociadas al complemento.

Ejemplos específicos de enfermedades y trastornos inflamatorios y relacionados con el sistema inmunitario asociados al complemento que pueden abordarse por las variantes de CRlg de este documento se han enumerado anteriormente.

Se ilustran detalles adicionales de la invención por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Preparación de variantes de CRlg de afinidad madurada

Materiales y métodos

Materiales:

Materiales-Enzimas y fago auxiliar M13-KO7 (New England Biolabs); inmunoplasmas Maxisorp (Nunc. Roskilde, Dinamarca); placa de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (COSTAR; n.º cat. 3365); placa no de unión de fondo plano de 96 pocillos (NUNC; n.º cat. 269620); conjugado de peroxidasa de rábano rusticano/anticuerpo anti-M13 (Farmacia); 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina, sustrato de H₂O₂ peroxidasa (TEB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc); *Escherichia coli* XL1-blue y *E. coli*. BL21(DE3) (Stratagene); albúmina sérica bovina (BSA) y Tween 20 (Sigma); Ni-NTA agarosa (Qiagen); RBC de conejo (Colorado Serum Company; n.º cat. CS1081); tampón Veronal de gelatina (GVB) [100 ml de tampón Veronal (BioWhittaker; n.º cat. 12-624E); gelatina (piel bovina tipo B; SIGMA; n.º cat. G9391-100G); suero reducido en C1q (CompTech; n.º cat. A300); proteína fH (Complement Technology; n.º cat. A137); Anti-FLAG-HRP, mAb en glicerol al 50 %, Sigma n.º cat. A-8592 1,1 mg/ml.

Construcción de bibliotecas de CRlg de presentación en fagos

Se ligó un fragmento de ADN que codificaba CRlg en un vector fagómico digerido con XhoI y SpeI (p3DvlzPDZ-gD) (Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)) como control de tipo silvestre y el molde para el diseño de variantes de CRlg. Después, se prepararon los moldes con el codón de parada TAA en cada resto dirigido para aleatorización a partir de células de *E. coli* CJ239 (Kunkel et al., 1987, supra). Se usó una estrategia de aleatorización suave para la selección de variantes de CRlg, en que se introdujo una tasa de mutación de aproximadamente el 50 % en la posición seleccionada usando una estrategia de oligonucleótido envenenado con mezclas 70-10-10-10 de bases que favorecen los nucleótidos de tipo silvestre. En el diseño de bibliotecas: 5=50 % A, 10 % G, 10 % C y 10 % T; 6=50 % G, 10 % A, 10 % C y 10 % T; 7=50 % C, 10 % A, 10 % G y 10 % T; 8=50 % T, 10 % A, 10 % G y 10 % C.

Se han diseñado cinco bibliotecas.

BCR1, ATC CTG GAA GTG CAA 656 (SEQ ID NO: 7) AGT GTA ACA GGA CCT 866 (SEQ ID NO: 8) 555 GGG GAT GTG AAT CTT (SEQ ID NO: 9) en la biblioteca 1;
 BCR2, AAG TGG CTG GTA CAA 768 (SEQ ID NO: 10) 668 TCA 657 775 688 577 ATC TTT (SEQ ID NO: 11) 786 CGT 657 TCT TCT GGA GAC CAT (SEQ ID NO: 12) en la biblioteca 2;
 BCR3, TTT CTA CGT GAC TCT (SEQ ID NO: 13) 877 668 657 757 588 756 756 678 555 TAC 756 GGC CGC CTG CAT GTVG (SEQ ID NO: 14) en la biblioteca 3;
 BCR4, CAA TTG AGC ACC CTG (SEQ ID NO: 15) 656 586 657 GAC 768 AGC CAC TAC ACG TGT 656 (SEQ ID NO: 16) GTC ACC TGG 756 (SEQ ID NO: 17) ACT CCT GAT GGC AAC (SEQ ID NO: 18) en la biblioteca 4;
 BCR5, ACT CCT GAT GGC AAC 756 (SEQ ID NO: 19) GTC 688 768 657 555 ATT ACT GAG CTC CGT (SEQ ID NO: 20) en la biblioteca 5.

Se realizó mutagénesis dirigida al sitio para las mutaciones puntuales como anteriormente usando codones apropiados para producir las mutaciones respectivas, y los clones correctos se confirmaron por secuencia.

Clasificación y cribado de biblioteca para seleccionar variantes de CRIg:

Se recubrieron inmunoplasmas Maxisorp durante una noche a 4 °C con C3b (5 µg/ml) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,05 % (p/v). Se añadieron bibliotecas de fagos a las placas recubiertas con C3b y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 h. Las placas se lavaron 10 veces y se eluyó el fago unido con HCl 50 mM y se neutralizaron con un volumen igual de base Tris 1,0 M (pH 7,5). Los fagos recuperados se amplificaron por pase a través de *E. coli* XL 1-blue y se usaron para rondas adicionales de selecciones de unión. Después de 5 rondas, se seleccionaron 12 clones individuales de cada biblioteca y se cultivaron en un formato de 96 pocillos en 50 µl de caldo 2YT suplementado con carbenicilina y fago auxiliar M13-KO7. Se añadieron sobrenadantes de cultivo diluidos en serie dos veces directamente en placas de 384 pocillos recubiertas con C3b, anti-gD, BSA y proteína no relacionada como posiciones diseñadas. La afinidad de unión se midió para estimar una concentración de fago que da C3b significativamente mayor que anti-gD pero no para BSA y la proteína no relacionada. Se fijó la concentración de fago, cribando aproximadamente 200 clones de cada biblioteca en el mismo formato y se seleccionaron 24-48 clones que mostraron unirse significativamente a C3b sobre anti-gD de cada biblioteca, después se secuenciaron para el análisis.

ELISA competitivo de fagos

Para estimar la afinidad de unión, se usó un ELISA modificado de fagos. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con 2 µg/ml de C3b en tampón carbonato 50 mM (pH 9,6) a 4 °C durante una noche. Las placas después se bloquearon con PBS, BSA al 0,5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las variantes de CRIg de presentación en fagos se diluyeron en serie en tampón PBT y se midió la unión para estimar una concentración de fago que da el 50 % de la señal en saturación. Se fijó la concentración de subsaturación de fago y se pre-incubaron durante 2 h con diluciones en serie de C3b, después se transfirió la mezcla a las placas de ensayo recubiertas con C3b. Después de incubación 15 minutos, las placas se lavaron con PBS, Tween 20 al 0,05 % y se incubaron 30 minutos con conjugado de peroxidasa de rábano rusticano/anticuerpo anti-M13 (dilución 1:5000 en tampón PBT). Las placas se lavaron, se revelaron con sustrato TMB, se inactivaron con H₃PO₄ 1,0 M y se leyeron de forma espectrofotométrica a 450 nm. La afinidad (CI₅₀) se calculó como la concentración de C3b competidor que provocaba la unión la mitad de la máxima del fagóido.

Purificación de proteínas

Se inoculó una única colonia de *E. coli* BL21(DE3) que albergada el plásmido de expresión en 30 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de carbenicilina (medio LB/carb) y se cultivó durante 1 noche a 37 °C. Las bacterias se recogieron, se lavaron, se resuspendieron y se inocularon en 500 ml de medio LB/carb. El cultivo se hizo crecer a 37 °C hasta fase semi-logarítmica ($A_{600}=0,8$). La expresión de proteínas se indujo con 1-tio-D-galactopiranosido de isopropilo 0,4 mM y el cultivo se hizo crecer durante 24 horas a 30 °C. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000 g durante 15 minutos, se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se congelaron durante 8 h a -80 °C. El sedimento se resuspendió en 50 ml de PBS y las bacterias se lisaron por pase a través del equipo de procesamiento Microfluidizer o equipos de sonicación. Las proteínas variantes de CRIg se purificaron con 2 ml de NI-NTA agarosa y filtración en gel.

ELISA de unión competitiva en fase fluida de mutCRIg-huFc:

Se diluyó huCRIg(L)-LFH hasta 2 µg/ml en PBS, pH 7,4 y se recubrió sobre placas de fondo plano de 384 pocillos Maxisorp (Nunc, Neptune, NJ) incubando durante una noche (16-18 horas) a 4 °C (25 µl/pocillo). Las placas se lavaron 3 veces en tampón de lavado (PBS, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 %) y se añadieron 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,4, BSA al 0,5 %) a cada pocillo. Se permitió que las placas se bloquearan durante 1-3 horas; esta y todas las incubaciones posteriores se realizaron en un agitador orbital a temperatura ambiente. Durante la

etapa de bloqueo, se diluyó C3b (purificado en Genentech) hasta 20 nM en tampón de ensayo (PBS, pH 7,4, BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,5 %) y las moléculas mutCRlg-huFc se diluyeron en serie en tampón de ensayo, sobre un intervalo de concentración de 20.000 - 0,34 nM. Las moléculas C3b y mutCRlg-huFc después se mezclaron 1:1 y se dejaron pre-incubar durante 0,5-1 hora. Las placas bloqueadas se lavaron 3 veces (como se ha descrito anteriormente) y se añadieron los complejos de C3b:mutCRlg-huFc a las placas de reacción (25 ul/pocillo). Después de una incubación de 1-2 horas, las placas ELISA se lavaron 3 veces (como se ha descrito anteriormente) y se detectó C3b unido a la placa por la adición de un anticuerpo anti-C3b humano (clon 5F202, US Biological, Swampscott, MA; 600 ng/ml, 25 ul/pocillo). Las placas se incubaron durante 1-2 horas y se lavaron como se ha descrito anteriormente. Después se añadió IgG anti-Fc murino conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluido 1:2000 (25 ul/pocillo) y las placas se incubaron durante 1-2 horas. Después de un lavado final, se añadieron 25 ul/pocillo de sustrato TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) a las placas ELISA. El desarrollo de color detuvo después de aproximadamente 8 minutos añadiendo 25 ul/pocillo de ácido fosfórico 1,0 M. Se determinó la absorbancia a 450 nM y 650 nM usando un lector de placa de microtitulación SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Ensayo de activación del complemento:

La capacidad de mutCRlg-Fc de inhibir la activación del complemento se evaluó usando el kit de la ruta alternativa del sistema del complemento Wieslab™ (Alpco Diagnostics, Salem, NH). Se prepararon mutCRlg-Fc diluido en serie (400 a 0,2 nM) y suero humano deficiente en C1q (al 5 %) (Complement Technology, Tyler, TX) a dos veces la concentración final deseada, se mezclaron 1:1 y se pre-incubaron durante 5 minutos en un agitador orbital a 600 rpm antes de la adición a las placas ELISA recubiertas con LPS (100 ul/pocillo). El resto del ensayo fue siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las muestras en las placas ELISA se incubaron durante 60-70 minutos a 37 °C y después se lavaron 3 veces en tampón de lavado (PBS, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 %). Se añadieron 100 ul/pocillo del conjugado anti-C5b-9 a la placa ELISA. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la placa ELISA se lavó como se ha descrito anteriormente y se añadieron 100 ul de sustrato/pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. El desarrollo de color se detuvo añadiendo 50 ul/pocillo de EDTA 5 mM. Se determinó la absorbancia a 450 nM usando un lector de placa de microtitulación MultiSkan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Milford, MA).

Ensayo de inhibición de hemólisis:

Se lavaron glóbulos rojos de conejo (Colorado Serum Company, Denver, CO) 3 veces con tampón Veronal (Sigma, St. Louis, MO) que contenía gelatina de piel bovina al 0,1 % (Sigma) (GVB), centrifugando a 1500 rpm, 4 °C durante 10 minutos para cada lavado. Después de la etapa de centrifugación final, las células se resuspendieron en GVB a una concentración final de 2×10^9 células/ml. Se añadieron inhibidores del complemento diluidos en serie en GVB a una o más placas de polipropileno de fondo en U de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) a 50 ml/pocillo seguido por 20 ml/pocillo de glóbulos rojos de conejo diluidos 1:2 en MgCl₂ 0,1 M/EGTA 0,1 M/GVB. La cascada del complemento en la placa se desencadenó por la adición de 30 µl/pocillo de suero reducido en C1q (Complement Technology, Tyler, TX), pre-diluido 1:3 con GVB. La placa o placas se incubaron con agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de detener la reacción con 100 µl/pocillo de EDTA 10 mM/GVB. Después de centrifugar la placa o placas a 1500 rpm durante 5 minutos, los sobrenadantes se transfirieron a una o más placas de 96-pocillos no de unión de fondo plano transparentes (Nunc, Neptune, NJ) y se leyeron las densidades ópticas a 412 nm usando un lector de microplaca (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Ensayo competitivo Alpha Screen:

La reactividad cruzada potencial de las moléculas CRlg mutantes con C3 se evaluó usando el kit de detección de histidina (quelato de níquel) AlphaScreen® (PerkinElmer, Waltham, MA). Se prepararon C3 y C3b humano diluidos en serie (3.000 a 0,7 nM), así como concentraciones fijas de iC3b biotinilado (30 nM) y tanto moléculas CRlg mutantes (mutCRlg) como moléculas CRlg de tipo silvestre (15-60 nM) a 3 veces la concentración final deseada, se mezclaron 1:1:1 y se pre-incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador orbital a 3000 RPM. Se preparó una mezcla 1:1 de perlas donantes de estreptavidina y perlasceptoras de quelato de níquel (0,1 mg/ml cada una) a 4 veces la concentración final deseada y se añadieron a la reacción. La placa de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos en un agitador orbital a 3000 rpm protegido de la luz. La placa se analizó en un analizador de microplaca AlphaQuest®-HTS (PerkinElmer, Waltham, MA).

Resonancia de plasmón superficial

Las afinidades de C3b por CRlg mutante y de tipo silvestre se determinaron usando mediciones de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore® A100 (GE healthcare). Se empleó un formato de captura anti-Fc y se calculó la K_D a partir de las mediciones de unión en equilibrio. El chip detector se preparó usando el kit de captura anti- μ Fc (BR-1008-38) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Se diluyó CRlg mutante o de tipo silvestre en tampón de ejecución (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,01 %) hasta 1 µg/ml y se hicieron inyecciones de 60 µl de modo que se capturaran ~100 RU de proteína de fusión en una mancha de la superficie del chip. Se registraron los sensogramas durante inyecciones de 10 minutos de soluciones de

concentración variada de C3b sobre la mancha de CRIg con sustracción de la señal para una mancha de referencia que contenía el anticuerpo de captura, pero no CRIg. Los datos se obtuvieron para una serie de dilución de factor 2 de C3b que variaba en concentración de 4 μ M a 15,6 nM con el caudal a 10 μ l/min y a una temperatura de 25 °C. La superficie se regeneró entre ciclos de unión por una inyección de 30 segundos de Gly-HCl 10 mM pH 1,7. Los valores constantes obtenidos al final de cada inyección de C3b se usaron para calcular la K_D usando el algoritmo Affinity del software de evaluación Biacore A100 Evaluation v1.1 (Safsten et al. (2006) Anal. Biochem. 353:181).

Resultados

Diseño de la biblioteca de fagos

Se usó la estructura cristalina de CRIg en complejo con C3b para diseñar bibliotecas diana. Se diseñaron cinco bibliotecas para cubrir el área de contacto entre CRIg y C3b (Figura 4). Las bibliotecas de CRIg se construyeron como una fusión a la proteína de cubierta minoritaria g3p en un vector de presentación en fagos monovalente (Zhang et al., J Biol Chem 281(31): 22299-311 (2006)). Se introdujeron codones de parada por mutagénesis en la parte codificante de CRIg del plásmido fágico en cada resto a aleatorizar. Cada construcción que contenía un codón de parada se usó después para generar la biblioteca de presentación en fagos (véase material y método). Se usó una estrategia de "aleatorización suave" para seleccionar agentes de unión para mantener una desviación de secuencia de tipo silvestre de modo que las posiciones seleccionadas se mutaran solamente el 50 % de las veces. Las cinco bibliotecas se obtuvieron con una diversidad promedio de $> 10^{10}$ secuencias independientes por biblioteca. (Tabla 1).

Selecciones con biblioteca en fagos de CRIg

Después de cuatro rondas de selección de unión, se obtuvieron 38 clones únicos de estas cinco bibliotecas. (Tabla 2). En la biblioteca 1, se conservó la lisina en la posición 15. Los restos aromáticos, tirosina y triptófano, remplazaron el ácido glutámico en la posición 8. La posición 4 estaba ocupada por el triptófano precursor o por una fenilalanina homóloga. En la biblioteca 2, se secuenciaron 24 clones y todos ellos se revelaron consenso. La posición 42, 46 y 47 se conservaron como tipo silvestre. La asparagina, histidina y fenilalanina remplazaron la secuencia de tipo silvestre en la posición 43, 44 y 45. En la biblioteca 3, se aleatorizaron 10 posiciones y las secuencias mostraron conservación completa en la posición 54, 55, 56, 57, 58, 61, 62 y 63. La isoleucina o lisina estaba ocupada en la posición 60. En la posición 64, se remplazó glutamina por arginina o se conservó. En la biblioteca 4, los restos aromáticos dominaban en la posición 86 y los restos básicos homólogos, arginina y lisina, dominaron en la posición 99. La posición 85, 87 y 95 también se aleatorizaron de forma suave, pero parecían altamente conservados. En la biblioteca 5, dos restos básicos homólogos significativos, lisina y arginina se prefirieron sobre glutamina en la posición 105. Los restos cargados negativamente, ácido aspártico o restos ácidos, asparagina estuvieron dominados en la posición 110.

Se estimaron las afinidades de algunos de los mutantes por ELISA competitivo de fagos (datos no mostrados), y se descubrió que había clones en la biblioteca 3 que eran agentes de unión a C3b aproximadamente ocho veces mejores que CRIg de tipo silvestre.

Determinación de la afinidad de unión in vitro y la potencia biológica in vivo

Para identificar restos críticos para aumentar la afinidad de unión a C3b y la potencia en el ensayo de inhibición hemolítica, el siguiente enfoque fue diseñar una segunda generación de variantes de CRIg incorporando una única mutación dominante y mantener otras posiciones como el tipo silvestre, o eligiendo 2-3 clones de alta afinidad de las bibliotecas de fagos de primera generación que se determinaron por ELISA de fagos. Para medir de forma precisa la afinidad y potencia de nuestros mutantes, se expresaron todas las variantes como proteínas aisladas. Los resultados (Tabla 3) del ensayo de inhibición hemolítica mostraron que L12 de la biblioteca 1, L33 de la biblioteca 3 y L41 de la biblioteca 4 aumentaban significativamente la potencia en 4 a 10 veces en comparación con el tipo silvestre en un ensayo hemolítico. L32 de la biblioteca 3 mostró CI50 mejorada 10 veces en comparación con CRIg de tipo silvestre. Los datos también demostraron que la afinidad de unión y la potencia de los ensayos basados en células no estaban correlacionadas.

Combinación de mutantes

Basándose en los resultados de las bibliotecas de segunda generación, se diseñó la tercera generación de mutantes para mejorar adicionalmente la potencia en el ensayo hemolítico y la afinidad de unión. Se eligieron tres de los mutantes biológicamente más potentes (L12-8W, L33-Q60I/L32-Q64R y L41-M86Y) y uno de los mutantes de mayor afinidad de unión (L32-Q64R) como molde. Después se combinaron estos mutantes con otros clones potentes biológicos obtenidos en la segunda generación de bibliotecas para determinar un conjunto óptimo de mutaciones que aumenten la potencia en el ensayo hemolítico y la afinidad de unión. Se expresaron y purificaron las variantes de CRIg para análisis detallado. Los datos mostraron (Tabla 4) que la combinación de mutantes de L12 no mejoraba la potencia de inhibición e incluso mostraban una actividad inferior en comparación con el mutante precursor a pesar de una afinidad de unión 3-6 mayor de los mutantes WL41 y WL59. Dentro de los mutantes de L32, RL41 mostró

una afinidad de unión 1,8 veces mejor que el tipo silvestre y una potencia 6 veces mejor en el ensayo hemolítico. Todos los mutantes del grupo L33 mostraron la afinidad de unión aumentada significativa; aproximadamente un aumento de 27-226 veces en comparación con el tipo silvestre, aunque la potencia en el ensayo de hemólisis no aumentó significativamente. También se apreció que 60I-64R y 86Y estaba implicado en la mayoría de las combinaciones de clones de afinidad mejorada.

Afinidad de unión mejorada y actividad inhibidora del complemento del mutante de CRlg Q64R M86Y

Se seleccionó el mutante Q64R M86Y, que tenía la mayor afinidad en el ELISA competitivo (Fig. 4 y Tabla 3) para análisis adicional. Para determinar la afinidad de unión de CRlg wt y CRlg Q64R M86Y por C3b, se realizó análisis Biacore de CRlg wt y CRlg Q64R M86Y. La afinidad de CRlg Q64R M86Y se mejoró 5 veces sobre CRlg de tipo silvestre (Fig. 6). Los estudios previos han demostrado que CRlg wt se une de forma selectiva a C3b pero no hace C3 nativo (Wiesman et al., Nature, 444(7116):217-20, 2006). Como la mutagénesis puede cambiar esta selectividad, se comparó la afinidad de CRlg Q64R M86Y por C3b frente a C3 en el ensayo competitivo en fase fluida alpha-screen. CRlg Q64R M86Y competía con C3b soluble, pero no con C3 soluble, lo que indica que la mutagénesis no afectaba a la selectividad de CRlg por el componente activo C3b (Fig. 7). Esta selectividad se confirmó adicionalmente por análisis de estos restos en la estructura de CRlg Q64R M86Y en el complejo con C3b (datos no mostrados).

Para ensayar si la afinidad mejorada y la selectividad conservada por C3b se traduce en eficacia mejorada, se ensayó CRlg Q64R M86Y frente a CRlg wt en un ensayo hemolítico basado en eritrocitos selectivo para la ruta alternativa del complemento. CRlg Q64R M86Y mostró una CI50 mejorada 4 veces en comparación con CRlg wt (Fig. 8A). Para corroborar adicionalmente la potencia mejorada hacia la inhibición del complemento de la ruta alternativa, se comparó la actividad inhibidora de CRlg Q64R M86Y con CRlg wt en un ensayo basado en LPS selectivo para la ruta alternativa del complemento. Aquí, CRlg mostró una mejora de 180 veces en CI50 en comparación con la proteína recombinante de tipo silvestre. CRlg wt y CRlg Q64R M86Y no afectaron a la actividad del complemento a través de la ruta clásica. Por tanto, una sustitución de dos aminoácidos en la superficie de contacto de unión CRlg-C3b produce una molécula con afinidad de unión mejorada y actividad superior inhibidora del complemento en dos ensayos diferentes con selectividad por la ruta alternativa del complemento.

Para determinar adicionalmente si la afinidad de unión y la potencia aumentada se traducen en eficacia terapéutica mejorada, se comparó el efecto protector de wt y la versión Q64R M86Y de CRlg en un modelo de transferencia de suero de artritis. Los estudios previos han demostrado que CRlg inhibe potencialmente la inflamación y la destrucción de hueso en artritis inducida por colágeno y anticuerpos (Katschke et al., J. Exp Med 204(6):1319-1325 (2007)).

Aquí, la eficacia de CRlg se ensayó en un tercer modelo preclínico de artritis mediada por el complejo inmunitario. Un modelo murino espontáneo de artritis reumatoide, K/BxN, imita muchas de las características clínicas e histológicas de la enfermedad humana con artritis. Se inyectó a los ratones 50 µl de suero obtenido de ratones K/BxN en día 0. Los animales se comprobaron diariamente y el grado de enfermedad se puntuó mediante observación visual. Todos los ratones se sacrificaron en el día 6.

Se inyectó a los ratones por vía subcutánea la cantidad indicada de control de isotipo o proteínas recombinantes hCRlg-mIgG1 o hCRlg-RL41-mIgG1 diariamente en 100 µl de solución salina estéril empezando en el día -1.

Control y valoración:

Puntuación para cada pata:

- 0 = Sin evidencias de eritema e hinchamiento
- 1 = Eritema e hinchamiento leve confirmado en el pie medio (tarso) o tobillo
- 2 = Eritema e hinchamiento leve que se extiende desde el tobillo hasta el pie medio
- 3 = Eritema e hinchamiento moderado que se extiende desde el tobillo hasta las articulaciones metatarsiales
- 4 = Eritema e hinchamiento grave que abarca el tobillo, pie y dedos

Puntuación media = suma de las 4 puntuaciones de la pata.

Fases de la enfermedad, leve (puntuación media 1-3), moderada (puntuación media 4-8) y enfermedad grave (puntuación media 9-superior). La puntuación media refleja la cantidad de articulaciones implicadas.

En el día 6, se recogió una muestra de sangre por punción intercardiaca con anestesia antes del sacrificio. Se medirá la cantidad de proteínas de fusión hCRlg-Fc usando el suero. Se recogieron las articulaciones para evaluación histológica.

La transferencia de suero de ratones KRN a destinatarios Balb/c produce una respuesta inmunitaria rápida y robusta caracterizada por inflamación simétrica de las articulaciones. La inducción de artritis está mediada por

autoanticuerpos anti-glucosa-6 fosfato isomerasa que forman complejos inmunitarios pro-inflamatorios en las articulaciones (Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., y Mathis, D. (1996). El desarrollo de artritis es completamente dependiente de la ruta alternativa del complemento intacta y de la función del receptor Fc como se muestra por la ausencia de enfermedad en ratones deficientes en los componentes de la ruta alternativa del complemento y en ratones deficientes en la cadena gamma del receptor Fc común (Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C., et al. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157-168). Debido a la rápida aparición y gravedad de la enfermedad, el tratamiento con la proteína de fusión CRlg wt-Fc reducía las puntuaciones de artritis solo en un 22 % (Fig. 9A, B). El tratamiento con CRlg Q64R M86Y mostró una reducción de las puntuaciones de artritis en un 66 %. El examen histológico mostró una reducción significativa en la infiltración de células inmunitarias que consisten principalmente en neutrófilos y macrófagos en ratones tratados con CRlg Q64R M86Y frente a ratones tratados con CRlg wt o proteína de fusión de control (Fig. 9C, D). Las concentraciones en suero de CRlg wt y CRlg Q64R M86Y fueron similares, lo que indica que la diferencia en las puntuaciones de artritis no se debía a una diferencia de la semivida de la proteína CRlg wt frente a CRlg Q64R M86Y. Por tanto, se demostró que la afinidad de unión aumentada de CRlg por su diana C3b se traduce en una eficacia terapéutica significativamente mejorada.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que se considera que son las realizaciones específicas, debe entenderse que la invención no está limitada a dichas realizaciones. Por el contrario, la invención pretende cubrir diversas modificaciones equivalentes con la condición de que estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> VARIANTES DE CRIG DE AFINIDAD MADURADA

<130> GNE-0322PCT

<140> Aún sin asignar

<141> Con la misma

<150> 61/189.653

<151> 20-08-2008

<150> 61/050.888

<151> 06-05-2008

<160> 67

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1372

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1261)

<400> 1

ccaactgcac ctcggttcta tcgataggag gctggaagaa aggacagaag tagctctggc	60
tgtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca gtg	109
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val	
1 5 10 15	
gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca gga	157
Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly	
20 25 30	
cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg caa	205
Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln	
35 40 45	
ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca gac	253
Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp	
50 55 60	
cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag cag	301
Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln	
65 70 75	
gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt oca gga gat	349
Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp	
80 85 90 95	
gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac tac	397
Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr	
100 105 110	
acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg aga	445

Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Gln	Thr	Pro	Asp	Gly	Asn	Gln	Val	Val	Arg	
			115					120					125			
gat	aag	att	act	gag	ctc	cgt	gtc	cag	aaa	ctc	tct	gtc	tcc	aag	ccc	493
Asp	Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	Ser	Lys	Pro	
		130					135					140				
aca	gtg	aca	act	ggc	agc	ggc	tat	ggc	ttc	acg	gtg	ccc	cag	gga	atg	541
Thr	Val	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Gln	Gly	Met	
	145					150					155					
agg	att	agc	ctt	caa	tgc	cag	gct	cgg	ggc	tct	cct	ccc	atc	agt	tat	589
Arg	Ile	Ser	Leu	Gln	Cys	Gln	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Ser	Tyr	
160					165					170					175	
att	tgg	tat	aag	caa	cag	act	aat	aac	cag	gaa	ccc	atc	aaa	gta	gca	637
Ile	Trp	Tyr	Lys	Gln	Gln	Thr	Asn	Asn	Gln	Glu	Pro	Ile	Lys	Val	Ala	
				180					185					190		
acc	cta	agt	acc	tta	ctc	ttc	aag	cct	gcg	gtg	ata	gcc	gac	tca	ggc	685
Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Phe	Lys	Pro	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Ser	Gly	
			195					200					205			
tcc	tat	ttc	tgc	act	gcc	aag	ggc	cag	gtt	ggc	tct	gag	cag	cac	agc	733
Ser	Tyr	Phe	Cys	Thr	Ala	Lys	Gly	Gln	Val	Gly	Ser	Glu	Gln	His	Ser	
		210					215					220				
gac	att	gtg	aag	ttt	gtg	gtc	aaa	gac	tcc	tca	aag	cta	ctc	aag	acc	781
Asp	Ile	Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	
	225					230					235					
aag	act	gag	gca	cct	aca	acc	atg	aca	tac	ccc	ttg	aaa	gca	aca	tct	829
Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Thr	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	
240						245				250					255	
aca	gtg	aag	cag	tcc	tgg	gac	tgg	acc	act	gac	atg	gat	ggc	tac	ctt	877
Thr	Val	Lys	Gln	Ser	Trp	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Tyr	Leu	
				260					265					270		
gga	gag	acc	agt	gct	ggg	cca	gga	aag	agc	ctg	cct	gtc	ttt	gcc	atc	925
Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Ile	
			275					280					285			
atc	ctc	atc	atc	tcc	ttg	tgc	tgt	atg	gtg	gtt	ttt	acc	atg	gcc	tat	973
Ile	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Cys	Cys	Met	Val	Val	Phe	Thr	Met	Ala	Tyr	
		290					295					300				
atc	atg	ctc	tgt	cgg	aag	aca	tcc	caa	caa	gag	cat	gtc	tac	gaa	gca	1021
Ile	Met	Leu	Cys	Arg	Lys	Thr	Ser	Gln	Gln	Glu	His	Val	Tyr	Glu	Ala	
	305					310					315					
gcc	agg	gca	cat	gcc	aga	gag	gcc	aac	gac	tct	gga	gaa	acc	atg	agg	1069
Ala	Arg	Ala	His	Ala	Arg	Glu	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Met	Arg	
320						325				330					335	
gtg	gcc	atc	ttc	gca	agt	ggc	tgc	tcc	agt	gat	gag	cca	act	tcc	cag	1117
Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser	Gln	
				340					345					350		
aat	ctg	ggc	aac	aac	tac	tct	gat	gag	ccc	tgc	ata	gga	cag	gag	tac	1165
Asn	Leu	Gly	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asp	Glu	Pro	Cys	Ile	Gly	Gln	Glu	Tyr	
			355					360					365			

ES 2 605 471 T3

cag atc atc gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg ctg gac aca	1213
Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr	
370 375 380	
ggt cct ctg gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa agt gtc tgt	1261
Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys	
385 390 395	
taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct agagtcgacc tgcagaagct	1321
tggccgcat ggcccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata a	1372

<210> 2
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 2

5

ES 2 605 471 T3

Met	Gly	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	His	Leu	Thr	Val	Asp	
1			5					10						15		
Thr	Tyr	Gly	Arg	Pro	Ile	Leu	Glu	Val	Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	
			20					25					30			
Trp	Lys	Gly	Asp	Val	Asn	Leu	Pro	Cys	Thr	Tyr	Asp	Pro	Leu	Gln	Gly	
		35					40					45				
Tyr	Thr	Gln	Val	Leu	Val	Lys	Trp	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Ser	Asp	Pro	
	50					55					60					
Val	Thr	Ile	Phe	Leu	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ile	Gln	Gln	Ala	
65					70					75					80	
Lys	Tyr	Gln	Gly	Arg	Leu	His	Val	Ser	His	Lys	Val	Pro	Gly	Asp	Val	
				85					90					95		
Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Leu	Glu	Met	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	
			100					105					110			
Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Gln	Thr	Pro	Asp	Gly	Asn	Gln	Val	Val	Arg	Asp	
		115					120					125				
Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Gln	Lys	Leu	Ser	Val	Ser	Lys	Pro	Thr	
	130					135					140					
Val	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Gln	Gly	Met	Arg	
145					150					155					160	
Ile	Ser	Leu	Gln	Cys	Gln	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Ser	Tyr	Ile	
				165					170					175		

Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
 195 200 205
 Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
 210 215 220
 Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
 245 250 255
 Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
 275 280 285
 Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
 290 295 300
 Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
 325 330 335
 Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln Asn
 340 345 350
 Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
 370 375 380
 Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
 385 390 395

<210> 3
 <211> 1090
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>

<221> CDS

<222> (67)..(981)

<400> 3

5

```

gtccaactgc acctcgggttc tatcgatagg aggctggaag aaaggacaga agtagctctg      60
gctgtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca      108
  Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr
    1           5           10
gtg gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca      156
Val Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr
  15           20           25           30
gga cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg      204
Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu
          35           40           45
caa ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca      252
Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser
          50           55           60
gac cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag      300
Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln
          65           70           75
cag gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga      348
Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly
          80           85           90
gat gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac      396
Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His
          95           100           105           110
tac acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg      444
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val
          115           120           125
aga gat aag att act gag ctc cgt gtc cag aaa cac tcc tca aag cta      492
Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu
          130           135           140
ctc aag acc aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa      540
Leu Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys
          145           150           155
gca aca tct aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat      588
Ala Thr Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp
          160           165           170
ggc tac ctt gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct gtc      636
Gly Tyr Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val
          175           180           185           190
ttt gcc atc atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc      684
Phe Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr
          195           200           205
atg gcc tat atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat gtc      732
Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val
          210           215           220
tac gaa gca gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa      780

```

ES 2 605 471 T3

Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	His	Ala	Arg	Glu	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu		
		225					230					235					
acc	atg	agg	gtg	gcc	atc	ttc	gca	agt	ggc	tgc	tcc	agt	gat	gag	cca		828
Thr	Met	Arg	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Pro		
		240				245					250						
act	tcc	cag	aat	ctg	ggc	aac	aac	tac	tct	gat	gag	ccc	tgc	ata	gga		876
Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gly	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asp	Glu	Pro	Cys	Ile	Gly		
		255			260					265					270		
cag	gag	tac	cag	atc	atc	gcc	cag	atc	aat	ggc	aac	tac	gcc	cgc	ctg		924
Gln	Glu	Tyr	Gln	Ile	Ile	Ala	Gln	Ile	Asn	Gly	Asn	Tyr	Ala	Arg	Leu		
				275					280					285			
ctg	gac	aca	gtt	oct	ctg	gat	tat	gag	ttt	ctg	gcc	act	gag	ggc	aaa		972
Leu	Asp	Thr	Val	Pro	Leu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Lys		
			290				295					300					
agt	gtc	tgt	taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct													1021	
Ser	Val	Cys															
		305															
agagtcgacc tgcagaagct tggccgccat ggcccaactt gtttattgca gcttataatg																	1081
gttacaata																	1090

<210> 4
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4

ES 2 605 471 T3

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

115		120		125											
Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Gln	Lys	His	Ser	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys
130						135						140			
Thr	Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Thr	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr
145					150					155					160
Ser	Thr	Val	Lys	Gln	Ser	Trp	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Tyr
				165					170					175	
Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Phe	Ala
			180					185					190		
Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Cys	Cys	Met	Val	Val	Phe	Thr	Met	Ala
	195						200					205			
Tyr	Ile	Met	Leu	Cys	Arg	Lys	Thr	Ser	Gln	Gln	Glu	His	Val	Tyr	Glu
	210					215					220				
Ala	Ala	Arg	Ala	His	Ala	Arg	Glu	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Met
225					230					235					240
Arg	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser
				245					250					255	
Gln	Asn	Leu	Gly	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asp	Glu	Pro	Cys	Ile	Gly	Gln	Glu
			260					265					270		
Tyr	Gln	Ile	Ile	Ala	Gln	Ile	Asn	Gly	Asn	Tyr	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp
	275						280					285			
Thr	Val	Pro	Leu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Lys	Ser	Val
	290					295					300				
Cys															
305															

<210> 5
 <211> 1590
 <212> ADN
 <213> *Mus* sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (134)..(973)

<400> 5

gtccaaactgc acctcgggttc tatcgattcg aattcggcca cactggccgg atcctctaga 60

gatccctcga cctcgaccca cgcgtccgag cagcaagagg atggaaggat gaatagaagt 120

agcttcaaatt agg atg gag atc tca tca ggc ttg ctg ttc ctg ggc cac 169
Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His
1 5 10

cta ata gtg ctc acc tat ggc cac ccc acc cta aaa aca cct gag agt 217
Leu Ile Val Leu Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser
15 20 25

gtg aca ggg acc tgg aaa gga gat gtg aag att cag tgc atc tat gat 265
Val Thr Gly Thr Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp
30 35 40

ccc ctg aga ggc tac agg caa gtt ttg gtg aaa tgg ctg gta aga cac 313
Pro Leu Arg Gly Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His
45 50 55 60

ggc tct gac tcc gtc acc atc ttc cta cgt gac tcc act gga gac cat 361
Gly Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His
65 70 75

atc cag cag gca aag tac aga ggc cgc ctg aaa gtg agc cac aaa gtt 409
Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val
80 85 90

cca gga gat gtg tcc ctc caa ata aat acc ctg cag atg gat gac agg 457
Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg
95 100 105

aat cac tat aca tgt gag gtc acc tgg cag act cct gat gga aac caa 505
Asn His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln
110 115 120

gta ata aga gat aag atc att gag ctc cgt gtt cgg aaa tat aat cca 553
Val Ile Arg Asp Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro
125 130 135 140

cct aga atc aat act gaa gca cct aca acc ctg cac tcc tct ttg gaa 601
Pro Arg Ile Asn Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu
145 150 155

gca aca act ata atg agt tca acc tct gac ttg acc act aat ggg act 649
Ala Thr Thr Ile Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr
160 165 170

gga aaa ctt gag gag acc att gct ggt tca ggg agg aac ctg cca atc 697
Gly Lys Leu Glu Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile
175 180 185

ttt gcc ata atc ttc atc atc tcc ctt tgc tgc ata gta gct gtc acc 745
Phe Ala Ile Ile Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr
190 195 200

ata cct tat atc ttg ttc cgc tgc agg aca ttc caa caa gag tat gtc 793
Ile Pro Tyr Ile Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val
205 210 215 220

tat gga gtg agc agg gtg ttt gcc agg aag aca agc aac tct gaa gaa 841
Tyr Gly Val Ser Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu
225 230 235

acc aca agg gtg act acc atc gca act gat gaa cca gat tcc cag gct	889
Thr Thr Arg Val Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala	
240 245 250	
ctg att agt gac tac tct gat gat cct tgc ctc agc cag gag tac caa	937
Leu Ile Ser Asp Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln	
255 260 265	
ata acc atc aga tca aca atg tct att cct gcc tgc tgaacacagt	983
Ile Thr Ile Arg Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys	
270 275 280	
ttccagaaac taagaagttc ttgctactga agaaaataac atctgctaaa atgccctac	1043
taagtcaagg tctactggcg taattacctg ttacttattt actacttgcc ttcaacatag	1103
ctttctccct ggcttccttt cttcttagac aacctaaagt atctatctag tctgccatt	1163
ctggggccat tgagaaatcc tgggtttggc taagaatata ctacatgcac ctcaagaaat	1223
ctagcttctg ggcttcaccc agaacaattt tottcttagg gccttcacaa ctcttctcca	1283
aacagcagag aaattccata gcagtagagg ttctttatca tgctccaga cagcgtgagt	1343
ctcagtccta caaactcaga caagcacatg ggtctaggat tactcctctt tctctagggc	1403
cagatgactt ttaattgata ttactattgc tacattatga atctaatagca catgtattct	1463
tttgttgta ataatgttt aatcatgaca tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaag ggcgccgcgc	1523
actctagagt cgacctgcag tagggataac agggtaataa gcttggccgc catggcccaa	1583
cttgttt	1590

<210> 6
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 6

ES 2 605 471 T3

Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu
1 5 10 15

Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr
20 25 30

Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly
35 40 45

Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser
50 55 60

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
65 70 75 80

Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
85 90 95

Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg Asn His Tyr Thr
100 105 110

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Ile Arg Asp
115 120 125

Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro Pro Arg Ile Asn
130 135 140

Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu Ala Thr Thr Ile
145 150 155 160

Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr Gly Lys Leu Glu
165 170 175

Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile Phe Ala Ile Ile
180 185 190

Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr Ile Pro Tyr Ile
195 200 205

Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val Tyr Gly Val Ser
210 215 220

Arg	Val	Phe	Ala	Arg	Lys	Thr	Ser	Asn	Ser	Glu	Glu	Thr	Thr	Arg	Val
225					230					235					240

Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala Leu Ile Ser Asp
245 250 255

Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln Ile Thr Ile Arg
260 265 270

Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys
275 280

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

```
<220>  
<221> base modificada  
<222> (16)..(18)  
<223> a, c, g o t
```

<220>
<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y

realizaciones preferidas

5 <400> 7
atcctggaag tgcaannn 18

<210> 8
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <220>
<221> base modificada
<222> (16)..(18)
<223> a, c, g o t

20 <220>
<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

25 <400> 8
agtgtaacag gacctnnn 18

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <220>
<221> base modificada
<222> (1)..(3)
<223> a, c, g o t

40 <220>
<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

45 <400> 9
nnnggggatg tgaatctt 18

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55 <220>
<221> base modificada
<222> (16)..(18)
<223> a, c, g o t

60 <220>
<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

65 <400> 10
aagtggtctg tacaannn 18

<210> 11

	<211> 24
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
	<220>
	<221> base modificada
10	<222> (1)..(3)
	<223> a, c, g o t
	<220>
	<221> base modificada
15	<222> (7)..(18)
	<223> a, c, g o t
	<220>
20	<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas
	<400> 11
	nnntcannnn nnnnnnnnat cttt 24
25	<210> 12
	<211> 24
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
30	<220>
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
	<220>
	<221> base modificada
35	<222> (1)..(3)
	<223> a, c, g o t
	<220>
	<221> base modificada
40	<222> (7)..(9)
	<223> a, c, g o t
	<220>
45	<223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas
	<400> 12
	nnncgtnnnt ctctggaga ccat 24
50	<210> 13
	<211> 15
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
55	<220>
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
	<400> 13
	tttctacgtg actct 15
60	<210> 14
	<211> 49
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
65	<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(27)
 <223> a, c, g o t

 10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (31)..(33)
 <223> a, c, g o t

 15 <220>
 <223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

 20 <400> 14
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntac nnnngccgcc tgcattgtvg 49

 25 <210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 35 <400> 15
 caattgagca ccctg 15

 40 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(9)
 <223> a, c, g o t

 55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(15)
 <223> a, c, g o t

 60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (31)..(33)
 <223> a, c, g o t

 65 <220>
 <223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

 <400> 16
 nnnnnnnnng acnnnagcca ctacacgtgt nnn 33

 <210> 17
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (10)..(12)
 <223> a, c, g o t
 10 <220>
 <223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas
 <400> 17
 gtcacctggn nn 12
 15 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 18
 actcctgatg gcaac 15
 25 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 35 <221> base modificada
 <222> (16)..(18)
 <223> a, c, g o t
 40 <220>
 <223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas
 <400> 19
 actcctgatg gcaacnnn 18
 45 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 55 <221> base modificada
 <222> (4)..(15)
 <223> a, c, g o t
 60 <220>
 <223> Véase como se indica en la memoria descriptiva en la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas
 <400> 20
 gtcnnnnnnn nnnnnattac tgagctccgt 30
 65 <210> 21

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocida

5

<220>
 <223> Descripción desconocida: Secuencia de tipo silvestre desconocida
 <400> 21

10

Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	Trp	Lys	Gly
1				5					10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 22

25

Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	Trp	Lys	Gly
1				5					10

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 23

35

Pro	Trp	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	Phe	Lys	Gly
1				5					10

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<400> 24

50

Pro	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	Phe	Lys	Gly
1				5					10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (8)..(8)
 <223> Trp o Phe

5 <400> 25

Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Xaa Lys Gly
 1 5 10

<210> 26
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>
 <223> Descripción desconocida: Secuencia de tipo silvestre desconocida

15 <400> 26

Gln Arg Gly Ser Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

20 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 27

Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

30 <210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

40 <400> 28

Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
 1 5 10

45 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>
 50 <223> Descripción desconocida: Secuencia de tipo silvestre desconocida

<400> 29

Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10

5 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 10 <400> 30

 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Arg Gly
 1 5 10

 15 <210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20 <400> 31

 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Lys Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10

 25 <210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 32

 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Gln Gly
 1 5 10
 35

 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Arg o Gln

 50 <400> 33

 Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Ile Ala Lys Tyr Xaa Gly
 1 5 10

 55 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Desconocida

<220>

<223> Descripción desconocida: secuencia de tipo silvestre desconocida

<400> 34

5

Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
1 5 10 15

Thr

<210> 35

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 35

Leu Glu Cys Asp Asp Gln Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Tyr
1 5 10 15

Thr

20

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 36

Leu Glu Cys Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
1 5 10 15

Thr

30

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40

<400> 37

Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 38

45

<211> 17

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 38

Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
 1 5 10 15

Thr

10 <210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 39

20 Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
 1 5 10 15

Thr

25 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 40

Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Thr

35 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41

Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

Thr

45

5 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 10 <400> 42

 Leu Glu Tyr Asp Asp Lys Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

 Thr

 15 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20
 <400> 43

 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Phe
 1 5 10 15

 Thr

 25 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 44

 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Tyr
 1 5 10 15

 Thr
 35

 40 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 45 <400> 45

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 46

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
1 5 10 15

Thr

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 47

Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
1 5 10 15

Thr

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 48

Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Thr

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 49

Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
1 5 10 15

Thr

5 <210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Tyr, Trp o Phe

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Lys o Arg

<400> 50

Leu Glu Xaa Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Xaa
1 5 10 15

Thr

25 <210> 51
<211> 8
<212> PRT
30 <213> Desconocida

<220>
<223> Descripción desconocida: Secuencia de tipo silvestre desconocida

35 <400> 51

Asn Gln Val Val Arg Asp Lys Ile
1 5

40 <210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 52

Asn Arg Val Val Arg Asp Asn Ile
1 5

50

5 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 10 <400> 53

 Asn Arg Val Val Arg Asp Asp Ile
 1 5

 15 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20
 <400> 54

 Asn Arg Val Val Arg Asp Gln Ile
 1 5

 25 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 55

 Asn Arg Val Ile Arg Asp Gln Ile
 1 5
 35

 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 45 <400> 56

 Asn Arg Val Ile Arg Asp His Ile
 1 5

 50 <210> 57
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 57

Asn Lys Val Ile Arg Asp Gln Ile
1 5

5 <210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 58

Asn Lys Val Ile Ala Asp Asn Ile
1 5

15 <210> 59
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 59

Asn Lys Val Ile Ser Asp Asn Ile
1 5

<210> 60
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 60

Asn Gln Val Ile Arg Ser Asp Ile
1 5

40 <210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 61

Asn Lys Val Thr Arg Asp Asn Ile
1 5

50 <210> 62
<211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 62

 Asn Lys Val Val Arg Asp Gln Ile
 1 5
 10
 <210> 63
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 63
 20
 Asn Lys Val Val Arg Asp Asn Ile
 1 5
 <210> 64
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 30 <400> 64
 Asn Lys Val Val Arg Asp Asp Ile
 1 5
 35
 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 65
 Asn Lys Val Val Arg Ser Asp Ile
 1 5
 45
 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 55 <400> 66

Asn Lys Val Val Ser Asp Asp Ile
1 5

5 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Lys o Arg

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Val o Ile

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gln, Asp o Asn

<400> 67

Asn Xaa Val Xaa Arg Asp Xaa Ile
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una variante de CRlg que comprende una sustitución de aminoácido en una o más posiciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 8, 14, 18, 42, 44, 45, 60, 64, 86, 99, 105 y 110 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que tiene una afinidad de unión por C3b aumentada al menos dos veces con respecto a CRlg humana de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2, y/o que es un inhibidor al menos 2 veces más potente de la ruta alternativa del complemento que CRlg humana de secuencia nativa de la SEQ ID NO: 2.
2. La variante de la reivindicación 1, que se une selectivamente a C3b sobre C3, o un fragmento de la misma.
3. La variante de la reivindicación 1, en la que la afinidad de unión y/o la potencia de inhibición están aumentadas en al menos 5 veces.
4. La variante de la reivindicación 1, en la que la afinidad de unión y/o la potencia de inhibición están aumentadas en al menos 10 veces.
5. La variante de la reivindicación 1, en la que la afinidad de unión está aumentada en al menos 90 veces.
6. La variante de la reivindicación 1, que comprende una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido 60, 64, 86, 99, 105 y 110 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
7. La variante de la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E8W, W14F, E8Y/W14F; P45F; G42D/D44H/P45F; Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; M86W, M86F, M86W/Q99R; M86F/Q99R; K110D, K110N; Q105R/K110N; Q105R/K110Q; y Q105K/K110D; o
 - (ii) una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; Q60I/Q105R/K110N; M86Y/E8Y; M86Y/G42D/D44H/P45F; M86Y/P45F; M86Y/G42D/D44H/P45F; y M86Y/Q99R/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N; o
 - (iii) una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q60I; Q64R; Q60I/Q64R; M86Y; Q99L; Q105K/K110D; E8W/Q105R/K110N; Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/E8Y; Q60I/Q64R/G42D; Q60I/Q64R/P45F; Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F; Q60I/Q64R/M86Y; Q60I/Q64R/Q105R; Q60I/Q64R/Q105K; Q60I/Q64R/K110N; M86Y/P45F; y M86Y/Q105K; o
 - (iv) una sustitución Q60I/Q64R/M86Y o Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F.
8. Una molécula quimérica que comprende una variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La molécula quimérica de la reivindicación 8, que es una inmunoadhesina.
10. La molécula quimérica de la reivindicación 9, en la que dicha variante de CRlg es más corta que la CRlg de longitud completa de la SEQ ID NO: 2.
11. La molécula quimérica de la reivindicación 10, que comprende un dominio extracelular de CRlg.
12. Una composición farmacéutica que comprende una variante de CRlg de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 8, o una inmunoadhesina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Una variante de CRlg de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 8, o una inmunoadhesina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en un método de tratamiento médico.
14. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o una afección asociadas al complemento.
15. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para el uso de la reivindicación 14, en donde dicha enfermedad asociada al complemento es:
 - (i) una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria; o
 - (ii) se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), lesión tisular remota después de isquemia y reperusión, activación del complemento durante cirugía de derivación cardiopulmonar, dermatomiositis, pénfigo, nefritis por lupus y glomerulonefritis y vasculitis

- 5 resultantes, derivación cardiopulmonar, disfunción endotelial coronaria inducida por cardioplejía, glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II, nefropatía por IgA, insuficiencia renal aguda, crioglobulinemia, síndrome antifosfolípido, degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, retinopatía diabética, alotrasplante, rechazo hiperagudo, hemodiálisis, síndrome de dificultad pulmonar oclusiva crónica (SDPC), asma, neumonía por aspiración, urticaria, urticaria idiopática crónica, síndrome urémico hemolítico, endometriosis, choque cardiogénico, lesión por isquemia-reperusión y esclerosis múltiple (EM); o
- 10 (iii) se selecciona del grupo que consiste en enfermedad inflamatoria del intestino (EII), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna paroxísmica), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como
- 15 esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas (por ejemplo, fibrosis quística), enteropatía sensible a gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas autoinmunitarias o mediadas por el sistema inmunitario incluyendo enfermedades cutáneas bullosas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante incluyendo rechazo de injertos, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Alzheimer, hemoglobinuria nocturna paroxísmica, angioedema hereditario, aterosclerosis y glomerulonefritis membranoproliferativa de tipo II; o
- 20 (iv) artritis reumatoide (AR); o
- 25 (v) una afección ocular asociada al complemento, en donde dicha enfermedad ocular asociada al complemento se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en todas las fases de degeneración macular relacionada con la edad (DME), uveítis, retinopatías diabéticas y otras retinopatías relacionadas con isquemia, endoftalmitis y otras enfermedades neovasculares intraoculares, y en donde la enfermedad neovascular intraocular se selecciona
- 30 opcionalmente del grupo que consiste en edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis del ojo, oclusión de la vena retiniana central (OVRC), neovascularización de la córnea y neovascularización de la retina.
- 35 16. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para el uso de la reivindicación 15 parte (v), en donde dicha afección ocular asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (DME), neovascularización coroidea (NVC), retinopatía diabética (RD) y endoftalmitis.
- 40 17. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para el uso de la reivindicación 16, en donde dicha DME es DME húmeda.
18. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para el uso de la reivindicación 16, en donde dicha DME es DME seca o atrófica.
- 45 19. La variante de CRlg, la molécula quimérica o la inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 13 para el uso de la reivindicación 14, en donde dicho sujeto es un mamífero y en donde dicho mamífero es opcionalmente un ser humano.

1 CCAACTGCAC CTCGGTCTTA TCGATAGGAG GCTGGAAGAA AGSACAGAAG TAGCTCTGGC TGTGATGGG ATCTTACTGG GCCTGCTACT CCTGGGGCAC
 GGTGACGTG GAGCCAAGAT AGCTATCCTC CGACCTTCTT TCCTGCTCTC ATCGAGACCG ACACTACCCC TAGAATGACC CGGACGATGA GGACCCCGTC
 1 M G I L L G L L L L G H
 *MET
 101 CTAAACAGTGG ACACTTATGG CCGTCCCATC CTGGAAGTGC CAGAGAGTGT AACAGGACCT TGGAAAGGGG AIGTGAATCT TCCCTGCACC TATGACCCCC
 GATTGTCACC TGTGAATACC GGCAGGGTAG GACCTTCAAG GTCTCTCACA TTGTCTGGA ACCTTTCCCC TACACTTAGA AGGACGTGG ATACTGGGGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L
 201 TGCAAGGCTA CACCAAGTC TTGGTGAAGT GGCTGGTACA ACGTGGCTCA GACCCGTGTA CCATCTTCTT ACGTGACTCT TCTGGAGACC ATATCCAGCA
 ACGTTCCGAT GTGGTTCAG AACCACTTCA CCGACCATGT TGCACCGAGT CTGGACAGT GGTAGAAAGA TGCACCTGAGA AGACCTCTGG TATAGGTCTGT
 47 Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q
 301 GGCAAAGTAC CAGGGCCGCC TGCATGTGAG CCACAAGGTT CCAGGAGATG TATCCCTCCA ATTGAGCACC CTGGAGATGG ATGACGGGAG CCACTACAOG
 CCGTTTCATG GTCGGCGGG ACGTACACTC GGTGTTCCAA GGTCTCTTAC ATAGGAGGT TAACTGGTGG GACCTCTACC TACTGGCCTC GGTGATGTGC
 80 A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 TGTGAAGTCA CCTGGCAGAC TCCTGATGGC AACCAAGTGG TGAGAGATAA GATTACTGAG CTCGGTGTCG AGAACTCTC TGTCTCCAAG CCCACAGTGA
 ACACTTCAG GGACCGTCTG AGGACTACCG TTGGTTCAGC ACTCTCTATT CTAATGACTC GAGGCACAGG TCCTTGAGAG ACAGAGGTTT GGGTGTCACT
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T
 501 CAACTGGCAG CGGTTATGGC TTCACGGTGC CCCAGGAAT GAGGATTAGC CTTCAATGCC AGGCTGGGG TTCTCTCCC ATCAGTTATA TTGGTATAA
 GTTGACCGTC GCCAATACCG AAGTGCCACG GGGTCCCTTA CTCCTAATCG GAAGTTACGG TCCGAGCCCC AAGAGGAGGG TAGTCAATAT AAACCATATT
 147 T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K

FIG. 1A

601 GCAACAGACT AATAACCAGG AACCATCAA AGTAGCAACC CTAAGTACCT TACTCTTCAA GCGTGGGTG ATAGCGACT CAGGCTCCTA TTTCTGCACT
 CGTTGTCTGA TTATTGGTCC TTGGGTAGTT TCATCGTTGG GATTTCATGA ATGAGAAGTT CGGACGCCAC TATCGGCTGA GTCGAGGAT AAAGACGTGA
 180 Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T
 701 GCCAAGGGCC AGGTGGCTC TGACGAGCAC AGGACATTG TGAAGTTGT GGTCAAAGAC TCCTCAAAGC TACTCAAAGC CAAGACTGAG GCACCTACAA
 CCGTTCCCGG TCCAACGAG ACTCGTGTG TGCTGTAAAC ACTTCAACA CCAGTTCTG AGGAGTTTCG ATGAGTTCTG GTTCTGACTC CGTGGATGTT
 213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T
 801 CCATGACATA CCGCTTGAAA GCAACATCTA CAGTGAAGCA GTCCGGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGGG GAGACCAGTG CTGGGCCAGG
 GGTACTGTAT GGGGAACCTTT CGTTGTAGAT GTCACCTTGT CAGGACCTG ACCTGGTGAC TGTAACCTACC GATGGAACCT CTCTGGTCAC GACCCGGTCC
 247 M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G
 901 AAAGAGCCTG CCTGTCTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGTGTA TGGTGTGTT TACCATGGCC TATATCATGC TCTGTGGAA GACATCCCAA
 TTTCTGGAC GGACAGAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACAGACAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTAGG AGACAGCCTT CTGTAGGGTT
 280 K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q
 1001 CAAGAGCATG TCTACGAGC AGCCAGGGCA CATGCCAGAG AGGCCAAGA CTCTGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT CGCAAGTGGC TGCTCCAGTG
 GTTCTGTAC AGATGCTTGG TGGTCCCGT GTAAGGCTC GTAAGGCTCTT GAGACCTCTT TGGTACTCC ACCGGTAGAA GGGTTCAACG ACGAGGTAC
 313 Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D
 1101 ATAGGCCAAC TTCCAGAAAT CTGGGCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGGCCAG ATCAATGGCA ACTACGCCCG
 TACTGGGTG AAGGCTCTTA GACCGTTGT TGATGAGACT ACTCGGACG TATCCTGTCC TCATGGTCTA GTAGCGGTG TAGTTACGT TGATGGCGGC
 347 E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R
 1201 CCTGCTGGAC ACAGTTCCTC TGGATTATGA GTTCTGACC ACTGAGGCA AAAGTGTCTG TTAAAAATGC CCCATTAGGC CAGGATCTGC TGACATAATC
 GGACGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAGACCGG TGACTCCCGT TTTACAGAC AATTTTACG GGGTAATCCG GTCTAGACG ACTGTATTAG
 380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O
 1301 TAGAGTCGAC CTGCAGAAGC TTGGCCGCCA TGGCCCAACT TGTATTATGC AGCTTATAAT GGTACAAAT AA
 ATCTCAGCTG GACGTCTTGG AACGGGGGT ACGGGGTGA ACAATAAG TGAATATTA CCAATGTTTA TT

FIG. 1B

1 GTCCAAC1GC ACCTGGGTTT TATCGATAGG AAGCTGGAG AAAGGACAGA AGTAGCTCTG GCTGTGATGG GGAICTTACT GGGCCTGCTA CTCCTGGGGC
 CAGGTTGACG TGGAGCCAAG ATAGCTATCC TCCGACCTTC TTTCCTGCTC TCATCGAGAC CGACACTACC CCTAGAAATGA CCGCGAGGAT GAGGACCCCG
 1 M G I L L G L L L L G H
 ^inserto empieza aqui
 101 ACCTAACAGT GGACACTTAT GGGCGTCCCA TCCTGGAAGT GGCAGAGAGT GTAACAGGAC CTTCGAAAGG GGAITGTGAAT CTTCCCTGCA CCTATGACCC
 TGGATTGTCA CCTGTGAATA CCGGCAGGGT AGGACCTTCA CGGTCTCTCA CATTGTCTTG GAACCTTTCC CCTACACTTA GAAGGGACGT GGATACTGGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P
 201 CCTGCAAGGC TACACCCAAG TCTTGGTGAA GTGGCTGGIA CAAAGTGGCT CAGACCTGT CACCATCTTT CTAAGTGACT CTTCTGGAGA CCATATCCAG
 GGACGTTCCG ATGTGGTTC AGAACCACTT CACCGACCAT GTTCACCGGA GTCTGGGACA GTCTGGGAAA GATGCACTGA GAAGACCTCT GGTATAGGTC
 46 L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q
 301 CAGGCAAAGT ACCAGGGCG CCTGCATGTG AGCCACAAGG TTCCAGGAGA TGTATCCCTC CAATTGAGCA CCTGGAGAT GGATGACCG AGCCACTACA
 GTCCGTTTCA TGGTCCCGGC GGAAGTACAC TGGTGTGTTCC AAGTCTCTCT ACATAGGGAG GTTAACTGCT GGGACCTCTA CCTACTGGCC TCGGTGATGT
 79 Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 CGTGTGAAGT CACCTGGCAG ACTCCTGATG GCAACCAAGT CGTGAGAGAT AAGATTACTG AGCTCGTGT CCAGAAACAC TCCTCAAAGC TACTCAAGAC
 GCACACTTCA GTGGACCGTC TGAGGACTAC CGTTGGTTCA GCACTCTCTA TTCTAATGAC TCGAGGCACA GGTCTTTGTG AGGAGTTTG ATGAGTTCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T
 501 CAAGACTGAG GCACCTACAA CCATGACATA CCGCTTGAAA GGAACATCTA CAGTGAAGCA GTCCCTGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGGG
 GTTCTGACTC CGTGGATGTT GGTACTGTAT GGGGAAGTTT CGTTGTAGAT GTCACTTCGT CAGGACCGCTG ACCTGGTGAC TGTACCTACC GATGGAACCT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

FIG. 2A

601 GAGACCAGTG CTGGCCAGG AAGAGCCCTG CCTGCTTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGCTGTA TGGTGGTTT TACCATGGCC TATATCATGC
 CTCTGGTCAC GACCGGTCC TTTCTGGAC GGACAGAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACACGACAT ACCACCAAAA ATGTACCGG ATATAGTACG
 179 E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L

 701 TCTGTGGAA GACATCCCAA CAAGAGCATG TCTAGGAAG AGCCAGGGCA CATGCCAGAG AGGCCAAGCA CTCTGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT
 AGACAGCCTT CTGTAGGTT GTTCTGTAC AGATGCTTCG TCGGTCCCGT GTACGGTCTC TCCGGTGGT GAGACCTCTT TGGTACTCCC ACCGGTAGAA
 213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F

 801 OGCAGTGGC TGCTCCAGTG ATGAGCCAAC TTCCAGAAAT CTGGGCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCCAG
 GCGTTCACCG ACGAGGTCAC TACTGGTTG AAGGCTCTTA GACCGTGTGT TGATGAGACT ACTCGGAGG TATCCTGTGCC TCATGGTCTA GTAGCGGGTC
 246 A S G C S D E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q

 901 ATCAATGGCA ACTAGCCCG CCTGCTGGAC ACAGTTCCTC TGGATTATGA GTTCTGGCC ACTGAGGGCA AAAGTGTCTG TTAAAAATGC CCCATTAGGC
 TAGTTACCGT TGATGGGGG GGAGGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAGACCGG TGACTCCGT TTTACAGAG AATTTTACG GGGTAATCCG
 279 I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

 1001 CAGGATCTG TGACATAATC TAGAGTOGAC CTGCAGNAGC TTGGCCGCCA TGGCCCAACT TGTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAATA
 GTCTAGACG ACIGTATTAG ATCTCAGCTG GAAGTCTTCG AACCGGCGT ACCGGGTGA ACAATAAG TCGAATATTA CCAATGTTAT
 ^inserto finaliza aqui

FIG. 2B

```

1  GTCCAACTGC ACCTGGTTC TATOGATTGG AATTGGGCCA CACTGGCGGG ATCCTCTAGA GATCCCTCGA CCGGTCCGAG CAGCAAGAGG
   CAGGTTGAGG TGGAGCCAAG ATAGCTAAGC TTAAGCCGGT GTGACCGGCC TAGGAGATCT CTAGGAGCT GGAGCTGGT GCGCAGGCTC GTCGTTCTCC

101 ATGGAAGGAT GAATAGAAGT AGCTTCAAT AGGATGGAGA TCTCATCAGG CTTCGTGTTT CTGGCCACC TAATAGTCT CACCTATGGC CACCCACACC
   TACCTTCTTA CTTATCTTCA TCGAAGTTTA TCCTACCTCT AGAGTAGTCC GAAAGACAAG GACCGGTGG ATTATACGA GTGGATACCG GTGGGGTGGG

1  M E I S S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
   *MET

201 TAAAAACACC TGAGAGTGTG ACAGGACCT GGAAGGAGA TGTGAAGATT CAGTGCATCT ATGATCCCCT GAGAGCTAC AGGCAAGTTT TGGTGAATG
   ATTTTGTGG ACTCTCACAC TGTCCCTGGA CCTTTCCTCT ACACCTCTAA GTCAAGTAGA TACTAGGGA CTCTCGATG TCGTTTCAA ACCACTTTAC
24  K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GCTGGTAAGA CAGGCTCTG ACTCGTGC CATCTTCTTA CGTCACTCCA CTGGAGACCA TATCCAGCAG GCAAAGTACA GAGCGCGCT GAAAGTGAGC
   OGACCATTTCT GTCCCGAGAC TGAGCCAGTG GTAGAAGGAT GCACTGAGGT GAOCCTCTGGT ATAGGTCTGT OGTTCATGT CTCGGCGGA CTTTCACTCG
57  L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CACAAAGTTC CAGGAGATGT GTCCCTCCAA ATAAATACCC TGCAGATGGA TGACAGGAAT CACTATACAT GTAGGTAC CTGGCAGACT CCTGATGGAA
   GTGTTTCAAG GTCTCTACA CAGGAGGTT TATTTATGGG ACGTGTAOCT ACTGTCTTA GTGATATGTA CACTCCAGTG GACCGTCTGA GGACTACCTT
90  H K V P G D V S L Q I N T L Q M D D R N H Y T C E V T W Q T P D G N

```

FIG. 3A

501 ACCAAGTAAT AAGAGATAAG ATCATTGAGC TCGGTGTTGG GAAATATAAT CCACCTAGAA TCAATACTGA AGCACCTACA ACCCTGCACCT CCTCTTTGGGA
 TGGTTTCATTA TTCTCTATTG TAGTAACTCG AGGCACAAGC CTTTATATTA GGTGGATCTT AGTTATGACT TCGTGGATGT TGGGACGTGA GGAGAAACCT
 124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E

 601 AGCAACAACCT ATAATGAGTT CAACCTCTGA CTTGACCACCT AATGGGACTG GAAAACCTTGA GGAGACCATT GCTGGTTTCAG GGAGGAACCT GCCAATCTTT
 TGGTTGTGA TATTACTCAA GTTGGAGACT GAACCTGGTGA TTACCTGAC CTTTGAACCT CCTCTGGTAA CGACCAAGTC CCTCCTTGGGA CGGTTAGAAA
 157 A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F

 701 GCCATAATCT TCATCATCTC CCTTTGCTGC ATAGTAGCTG TCACCATACC TTATACTTG TTCCCTGCA GGACATTCCA ACAAGAGTAT GTCATGGAG
 CGGTATTAGA AGTAGTAGAG GCAACGACG TATCATCGAC AGTGGTATGG AATATAGAAC AAGGCGAGGT CCTGTAAAGT TGTCTCATA CAGATACCTC
 190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q Q E Y V Y G V

 801 TGAGCAGGGT GTTTCGAGG AAGACAAGCA ACTCTGAAGA AACCACAGG GTGACTACCA TCGCAACTGA TGAACCAGAT TOCCAGGCTC TGATTAGTGA
 ACTGGTCCCA CAAACGGTCC TTCTGTTCGT TGAGACTTCT TTGGTGTTCC CACTGATGGT AGGGTTGACT ACTTGGTCTA AGGGTOCGAG ACTAATCACT
 224 S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T D E P D S Q A L I S D

 901 CTACTCTGAT GATCCTTGCC TCAGCCAGGA GTACCAATA ACCATCAGAT CAACAATGTC TATTCCTGCC TGCTGAACAC AGTTTCCAGA AACTAAGAAG
 GATGAGACTA CTAGGAAGG AGTGGTCCCT CATGGTTTAT TGGTAGTCTA GTTGTACAG ATAAGGACGG ACGACTTGTG TCAAAGGTCT TTGATTCTTC
 257 Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O

 1001 TTCTTGGTAC TGAAGAAAAT AACATCTGCT AAAATGCCCC TACTAAGTCA AGGTCTACTG GCGTAATTAC CTGTTACTTA TTTACTACTT GCCTTCAACA
 AAGAAOGATG ACTTCTTTTA TTGTAGAOGA TTTTACGGGG ATGATTTCAGT TCCAGATGAC CGCATTAATG GACAATGAAT AAATGATGAA CCGAAGTTGT

FIG. 3B

```

1101 TAGCTTCTC CCTGGCTCC TTCTTCTTA GACAACCTAA AGTATCTATC TAGTCTGCCA ATTCTGGGCG CATTGAGAAA TCCTGGGTTT GGCTAAGAA
    ATCGAAAGAG GGACCGAAGG AAAGAAGAAT CTGTGGATT TCATAGATAG ATCAGACGGT TAAGACCCCG GTAACCTCTT AGGACCCCAA CCGATTCTTA

1201 ATACTACATG CACCTCAAGA AATCTAGCTT CTGGGCTTCA CCGAGAACA TTTCTCTCT AGGCGCTTCA CAACTCTTCT CCAAACAGCA GAGAAATTCC
    TATGATGTAC GTGGAGTTCT TTAGATCGAA GACCGAAGT GGGTCTTGTT AAAGAAGGA TCCCGAAGT GTTGAGAAGA GGTTTGCGT CTCTTTAAGG

1301 ATAGCAGTAG AGGTTCTTTA TCATGCTCC AGACAGCGTG AGTCTCAGTC CTACAACTC AGACAAGCAC ATGGGCTAG GATTACTCCT CTTTCTCTAG
    TATCGTCATC TCCAAGAAAT AGTACGAGG TCTGTGGCAC TCAGAGTCAG GATGTTTGAG TCTGTGCGT TACCCAGATC CTAATGAGGA GAAAGAGATC

1401 GGCCAGATGA CTTTAAATG ATATTACTAT TGCTACATTA TGAATCTAAT GCACATGTAT TCTTTGTG TTAATAATG TTTAATCATG ACATCAAAAA
    CCGGTCTACT GAAATTTAAC TATAATGATA ACGATGTAAT ACTTAGATTA CGGTACATA AGAAACAAC AATTATTTAC AAATTAGTAC TGTAGTTTTT

1501 AAAAAAAAAA AAGCGCGGCC GCGACTCTAG AGTGGACCTG CAGTAGGGAT AACAGGGTAA TAAGCTTGGC CGCCATGGCC CAACTTGTTT
    TTTTTTTTTT TTCCGCGCGG CGCTGAGATC TCAGCTGGAC GTCAICCTA TTGTCOCATT ATTCGAACCG GCGGTACCGG GTTGAACAAA
    ^pRK5 continúa aqui

```

FIG. 3C

Maduración de afinidad basada en estructura de CRIg para generar un inhibidor más potente

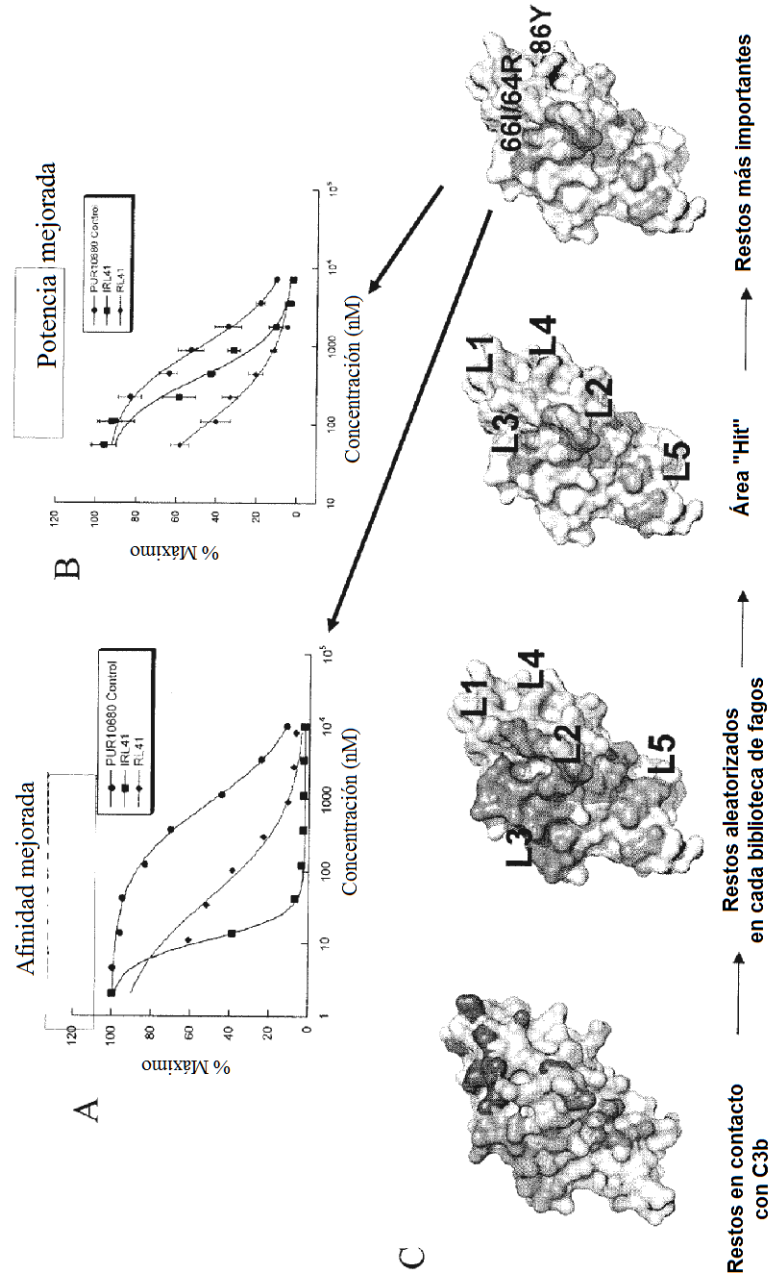
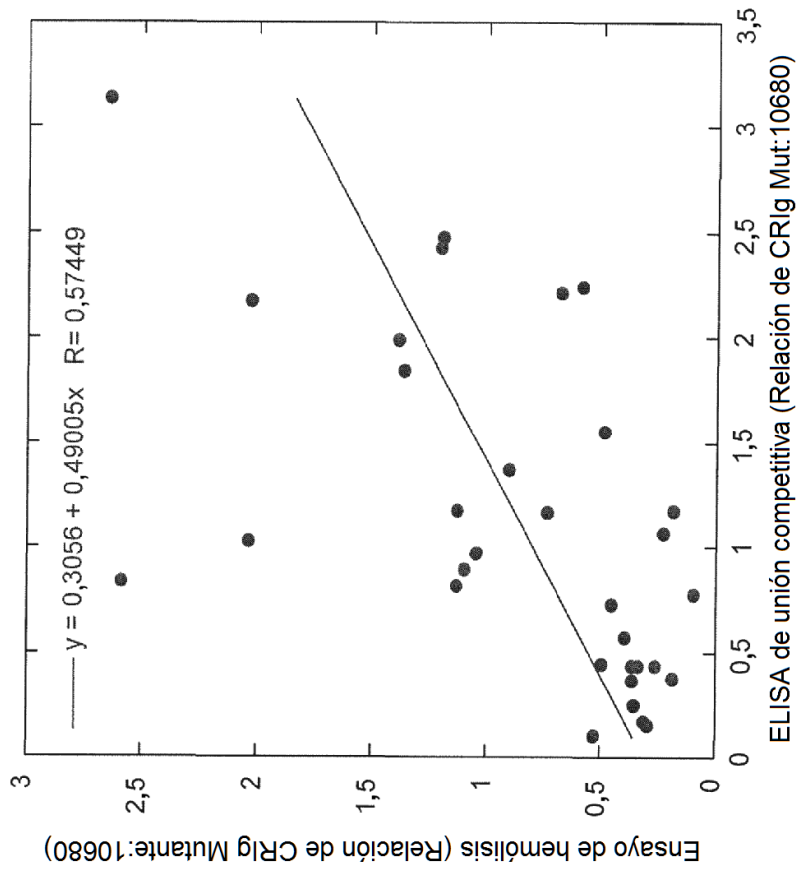


Fig. 4



La correlación entre ELISA competitivo y ensayo hemolítico

Fig. 5

Afinidad mejorada del mutante
de CRlg Q64R/M86Y

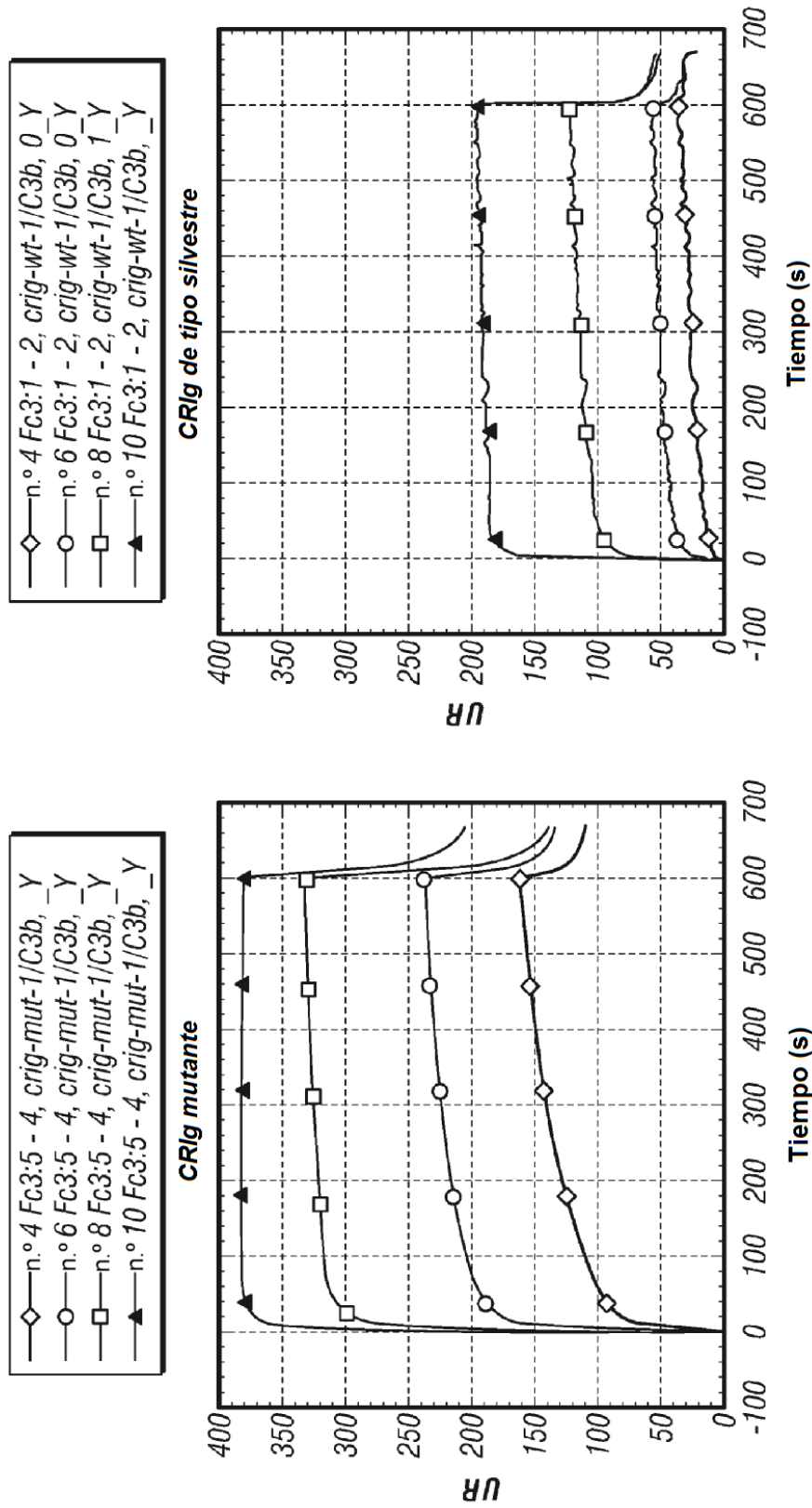


FIG. 6A

**Afinidad mejorada del mutante
de CRIg Q64R/M86Y**

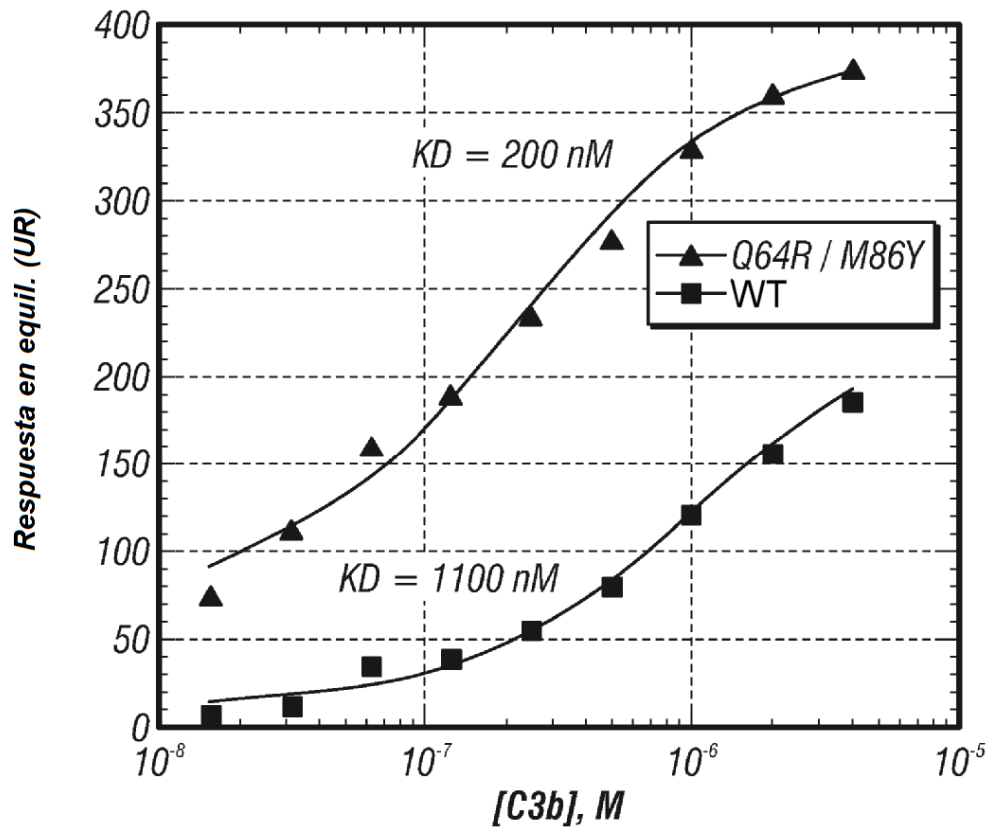


FIG. 6B

CRlg de afinidad mejorada permanece selectiva para C3b

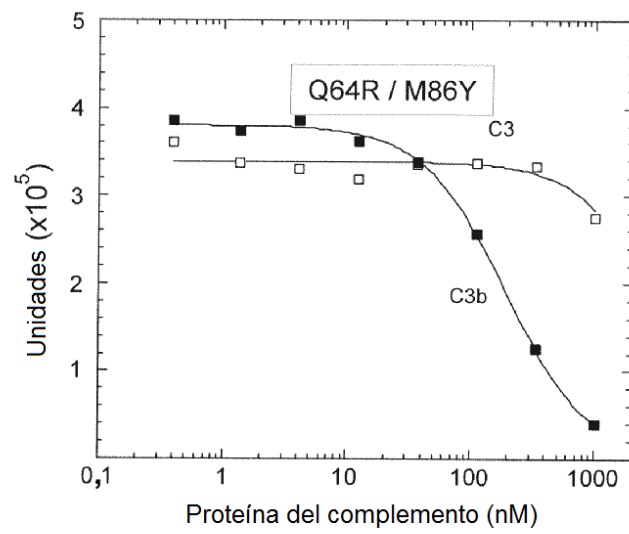


Fig. 7

Potencia inhibidora mejorada del complemento de CRlg Q64R/M86Y *in vitro* en comparación con CRlg de tipo silvestre

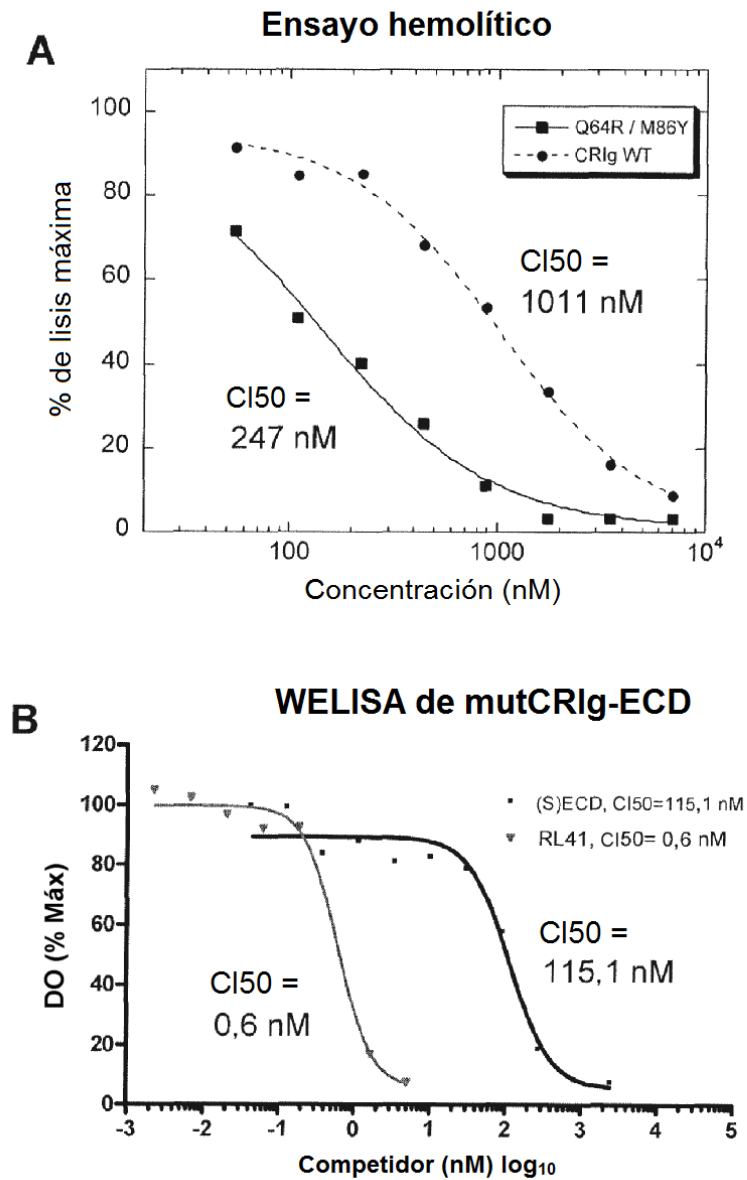


Fig. 8

CRlg Q64R/M86Y muestra eficacia mejorada
in vivo con respecto a CRlg WT *in vivo*

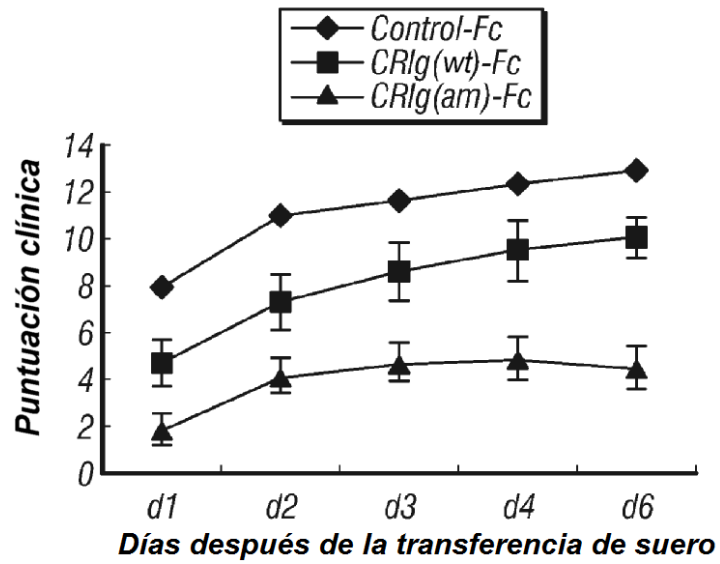


FIG. 9A

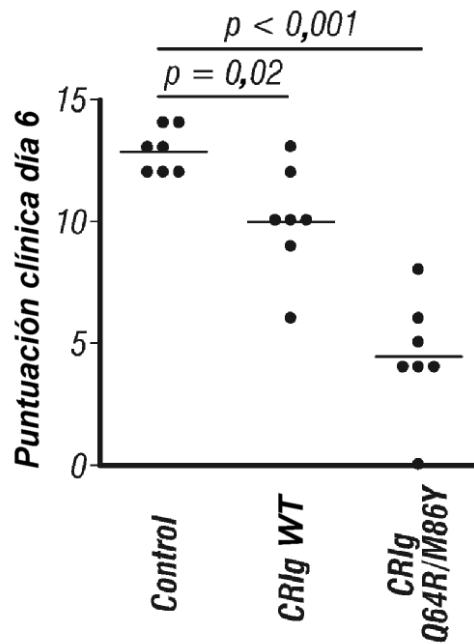


FIG. 9B

CRIg Q64R/M86Y muestra eficacia mejorada
in vivo con respecto a CRIg WT *in vivo*

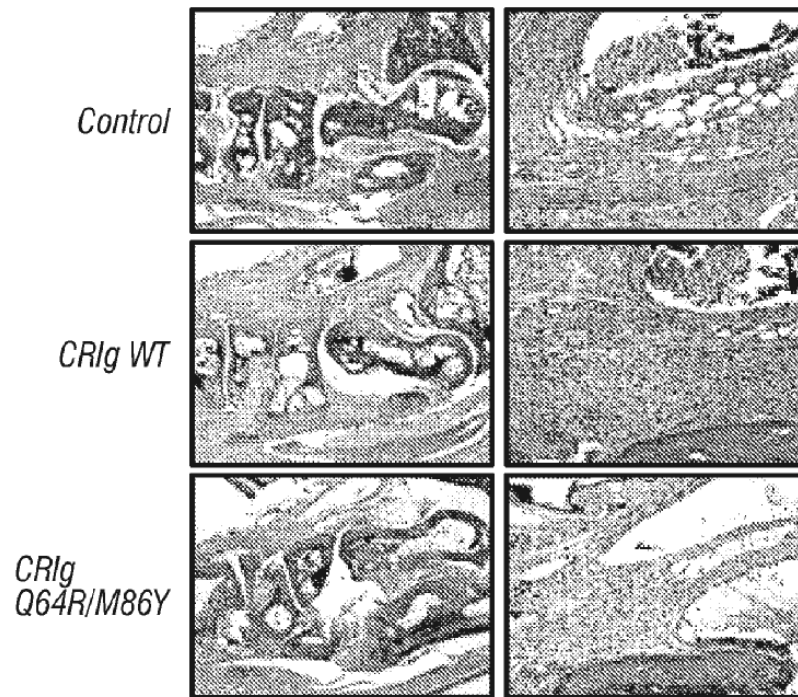


FIG. 9C

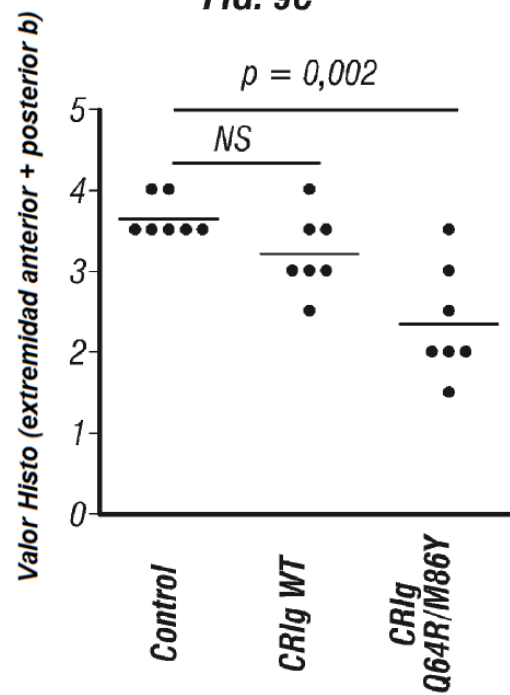


FIG. 9D

Tabla 1

Tabla 1. Bibliotecas de fagos

Biblioteca	Posición	Diversidad
Biblioteca 1	E8-K15	$1,2 \times 10^{10}$
Biblioteca 2	R41-T47	$1,4 \times 10^{10}$
Biblioteca 3	S54-Q64	$1,6 \times 10^{10}$
Biblioteca 4	E85-Q99	$1,2 \times 10^{10}$
Biblioteca 5	Q105-K111	$1,9 \times 10^{10}$

Generación por etapas de CRIg de afinidad mayor por presentación en fagos

Biblioteca 1

Posición	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
WT	P	E	S	V	T	G	P	W	K	G	
	P	V	S	V	T	G	P	W	K	G	
	P	W	S	V	T	G	P	F	K	G	
	P	Y	S	V	T	G	P	F	K	G	
Consenso	P	V	S	V	T	G	P	W	K	G	

☐ Aleatorizado suave
☒ No aleatorizado
☐ Seleccionado

Biblioteca 2

Posición	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
WT	Q	R	G	S	D	P	V	T	I	F	L	R	D	S
	Q	R	D	S	H	F	V	T	I	F	L	R	D	S
Consenso	Q	R	D	S	H	F	V	T	I	F	L	R	D	S

Biblioteca 3

Posición	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
WT	S	S	G	D	H	I	Q	Q	A	K	Y	Q	G
	S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	R	G
	S	S	G	D	H	I	Q	K	A	K	Y	Q	G
	S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	Q	G
Consenso	S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	R	G

Q

Biblioteca 4

Posición	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
WT	L	E	M	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T
	L	E	C	D	D	Q	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Y	T
	L	E	C	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T
	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T
	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T
	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T
	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	L	T
	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T
	L	E	Y	D	D	K	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T
	L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	F	T
	L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Y	T
	L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T
	L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T
	L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T
	L	E	F	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T
	L	E	F	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T
Consenso	L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T

W
F

Biblioteca 5

Posición	104	105	106	107	108	109	110	111
WT	N	Q	V	V	R	D	K	I
	N	R	V	V	R	D	N	I
	N	R	V	V	R	D	D	I
	N	R	V	V	R	D	Q	I
	N	R	V	I	R	D	Q	I
	N	R	V	I	R	D	H	I
	N	K	V	I	R	D	Q	I
	N	K	V	I	A	D	N	I
	N	K	V	I	S	D	N	I
	N	Q	V	I	R	S	D	I
	N	K	V	T	R	D	N	I
	N	K	V	V	R	D	Q	I
	N	K	V	V	R	D	N	I
	N	K	V	V	R	D	N	I
	N	K	V	V	R	D	D	I
	N	K	V	V	R	S	D	I
	N	K	V	V	S	D	D	I
Consenso	N	K	V	V	R	D	Q	I

R
I
D
N

Cada panel muestra clones que se seleccionaron de cada biblioteca basándose en la afinidad de unión a C3b. La secuencia se indica por el código de aminoácidos de una letra

Tabla 2

Tabla 3

		ELISA competitivo	Inhibición de hemólisis
	Nombre Mutantes	CI50 Mu (nM) WT-P10680 (nM) WT/Mu	CI50 Mu WT-P10680 WT/Mu
Biblioteca 1	L11 E8Y	384 332	439 591 1X
	L12 E8W	142 332	176 657 4X
	L13 W14F	882 332	293 596 2X
	L15 E8Y/W14F	1274 332	310 528 2X
	L21 G42D	453 332	378 416 1X
Biblioteca 2	L22 D44H	338 332	1207 591 0,5X
	L23 P45F	1266 332	358 528 1,5X
	L24 G42D/D44H/P45F	238 332	227 498 2X
	L31 Q60I	388 332	78 416 5X
Biblioteca 3	L32 Q64R	34 332	293 549 2X
	L33 Q60I/Q64R	255 332	51 492 10X
	L41 M86Y	123 332	124 657 5X
Biblioteca 4	L42 M86W	80 332	226 635 3X
	L43 M86F	604 332	185 794 4X
	L44 Q99K	268 332	588 520 1X
	L45 Q99R	1397 331	818 682 0,8X
	L46 Q99Y	468 332	1715 663 0,4X
	L47 Q99F	296 332	570 520 0,9X
	L48 Q99L	1376 332	828 682 0,8X
	L49 M86W/Q99R	55 332	201 635 3X
	L410 M86F/Q99R	121 332	273 746 3X
	L411 M86W/Q99K	1594 298	1980 747 0,4X
	L51 Q105R	599 298	901 794 0,9X
	L52 Q105K	491 298	696 663 1X
	L55 K110D	128 298	196 525 3X
	L56 K110N	132 298	376 746 1,2X
	L58 K110H	1105 298	1393 686 0,5X
	L59 Q105R/K110N	127 298	180 525 3X
Biblioteca 5	L510 Q105R/K110D	1011 298	954 686 0,7X
	L511 Q105R/K110Q	166 298	234 592 3X
	L512 Q105K/K110Q	937 298	814 596 0,7X
	L514 Q105K/K110D	46 298	167 549 3X

Tabla 4

		Mutantes	ELISA competitivo		Inhibición de hemólisis	
Nombre			CI50 Mu (nM) WT-P10680	WT/Mu	CI50 Mu	WT-P10680 WT/Mu
L12		E8W	142	332	2X	176 657 4X
W121		E8W/G42D	400	457	1X	1601 506 0.3X
W123		E8W/P45F	376	457	1X	2063 506 0.2X
W142		E8W/M86W	71	457	6X	416 506 1X
W151		E8W/Q105R/K110N	312	457	1X	475 506 1X
W155		E8W/K110N	374	457	1X	492 506 1X
W159		E8W/Q105R/K110N	276	457	12X	2340 506 0.2X
L32		Q64R	34	332	10X	293 549 2X
RL11		Q64R/E8Y	303	712	2X	390 506 1X
RL21		Q64R/G42D	490	712	1X	217 506 1X
RL23		Q64R/P45F	293	712	2X	375 506 1X
RL41		Q64R/M86Y	40	712	18X	85 506 6X
RL42		Q64R/M86W	56	712	13X	170 506 3X
RL46		Q64R/Q99Y	682	712	1X	473 506 1X
RL47		Q64R/Q99F	725	712	1X	669 506 0.8X
RL49		Q64R/Q99R	64	712	11X	177 506 3X
RL51		Q64R/Q105R/K110N	286	712	2X	227 506 2X
RL52		Q64R/Q105K	290	712	3X	222 506 2X
RL59		Q64R/Q105R/K110N	65	712	11X	208 506 2X
L33		Q601/Q64R	255	332	1X	51 492 10X
IRL11		Q601-Q64R/E8Y	34	903	27X	327 1052 3X
IRL21		Q601-Q64R/G42D	29	903	31X	386 1052 3X
IRL23		Q601-Q64R/P45F	31	903	29X	338 1052 3X
IRL24		Q601-Q64R/G42D/D44H/P45	4	903	226X	235 1052 4X
IRL41		Q601-Q64R/M86Y	10	903	90X	358 1052 3X
IRL51		Q601-Q64R/Q105R	24	903	38X	313 1052 3X
IRL52		Q601-Q64R/Q105K	22	903	41X	143 1052 7X
IRL55		Q601-Q64R/K110N	33	903	27X	292 1052 4X
IRL59		Q601/Q105R/K110N	15	903	60X	277 506 4X
L41		M86Y	123	332	3X	124 657 5X
YL11		M86Y/E8Y	75	457	6X	562 962 2X
YL21		M86Y/G42D/D44H/P45F	71	457	6X	220 962 4X
YL23		M86Y/P45F	7	457	65X	202 962 5X
YL24		M86Y/G42D/D44H/P45F	31	457	15X	248 962 4X
YL44		M86Y/Q99K	91	457	5X	250 962 4X
YL49		M86Y/Q99R	175	457	3X	392 962 2X
YL51		M86Y/Q105R	39	457	12X	417 962 2X
YL52		M86Y/Q105K	49	457	9X	224 962 4X
YL59		M86Y/Q105R/K110N	18	457	25X	515 962 2X