

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 732**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/245 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2011 PCT/US2011/026602**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011 WO2011109338**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11751164 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2542255**

54 Título: **Composiciones para tratar la enfermedad de Degos**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309393 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2017

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
352 Knotter Drive
Cheshire, CT 06410, US**

72 Inventor/es:

MAGRO, CYNTHIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 615 732 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

Composiciones para tratar la enfermedad de Degos

5 Campo técnico

El campo de la invención es la medicina, inmunología, biología molecular y química de proteínas.

Antecedentes

10 La enfermedad de Degos (también conocida como enfermedad de Kohlmeier y papulosis atrófica maligna (MAP)) es una vasculopatía rara (aproximadamente 200 casos informados) caracterizada por trombosis en vasos de pequeños a grandes. Véase, por ejemplo, Lester y Rapini (2009) *Curt Opin Gastroenterol* 25:66-73 y Englert et al., (1984) *Br Med J* 289:576. Aunque está generalmente considerada de etiología desconocida, la enfermedad de Degos se ha asociado con infecciones víricas (por ejemplo, parvovirus B 19 y VIH) y trastornos autoinmunitarios tales como eritematosis por lupus (LE), dermatomiositis y síndrome antifosfolípido primario (APS). Véase, por ejemplo, Crowson et al., (2002) *J Cutan Pathol* 29:596-601; Englert et al., (1984), *supra*; Heymann (2009) *J Am Acad Dermatol* 61:505-506; Durie et al., (1969) *Arch Dermatol* 100(5):575-581; Tsao et al., (1997) *J Arna Acad Dermatol* 36:317-319; y Requena et al., (1998) *J Arna Acad Dermatol* 38:852-856. Algunas formas de la enfermedad de Degos pueden ser familiares. Véase, por ejemplo, Katz et al., (1997) *J Am Acad Dermatol* 37:480-484 y Penault et al., (2004) *Ann Dermatol Venereol* 131:989-993. La enfermedad de Degos puede aparecer en pacientes de cualquier edad, aunque parece que afecta preferentemente a hombres sobre mujeres a una proporción de aproximadamente 3 a 1. Véase, por ejemplo, Katz et al., (1997), *supra*; Torrelo et al., (2002) *Br J Dermatol* 146:916-918; y Wilson et al., (2007) *Pediatr Dermatol* 24(1):18-24.

25 La enfermedad de Degos puede manifestarse como una forma puramente cutánea benigna o como una forma sistémica multiorgánica agresiva, la última de las cuales es generalmente mortal de uno a doce años después del diagnóstico. Scheinfeld (2007) *Clin Exp Derm* 32:483-487. El sello distintivo fenotípica de la enfermedad de Degos cutánea es la aparición de una o más pápulas eritematosas, de color rojizo en la piel, que son pápulas que cicatrizan con centros atróficos blancos.

30 La muerte aparece en casi todos los pacientes con la forma sistémica de enfermedad de Degos, teniendo los pacientes una esperanza de vida promedio después de la implicación sistémica de aproximadamente dos a tres años. Véase, por ejemplo, Scheinfeld (2007), *supra*. Los pacientes habitualmente mueren por perforación intestinal con o sin complicaciones sépticas; sin embargo, la muerte puede como alternativa resultar de infarto intestinal, colapso cardiopulmonar y/o infarto neurológico y hemorragia. *Id.* Véase también High et al., (2004) *J Am Acad Dermatol* 50(6):895-899.

35 No se ha definido un tratamiento médico convencional para la enfermedad de Degos. Muchos agentes terapéuticos han tenido solamente éxito marginal y/o inconsistente en el tratamiento de la enfermedad. Véase, por ejemplo, Scheinfeld (2007), *supra*. Por ejemplo, algunos pacientes con enfermedad de Degos se benefician de terapia con inmunoglobulina intravenosa, pero actualmente no parece haber un modo de predecir los pacientes que responderán a dicha terapia, véase, por ejemplo, Dyrssen et al., (2008) *J Cutan Pathol* 35(Supl. 1):20-25; Zhu et al., (2007) *Br J Dermatol* 157(1):206-207; y De Breucker et al., (2008) *Acta Clin Belg* 63(2):99-102 (Resumen).

40 En vista de lo anterior, está claro que existe una necesidad de nuevos enfoques y mejores métodos para tratar a pacientes con enfermedad de Degos.

Sumario

50 La presente descripción se basa, al menos en parte, en el descubrimiento por el inventor de que un inhibidor del complemento, concretamente el anticuerpo anti-C5 humanizado eculizumab, era muy eficaz en el tratamiento de un paciente aquejado de la forma sistémica de enfermedad de Degos. Por consiguiente, la descripción caracteriza una diversidad de composiciones y métodos útiles para la prevención y tratamiento de le enfermedad de Degos.

55 En un aspecto, la descripción proporciona un método para tratar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos, comprendiendo el método administrar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos un inhibidor del complemento en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad.

60 En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos, que incluye el método administrar de forma crónica a un paciente aquejado de enfermedad de Degos un inhibidor del complemento en una cantidad y con una frecuencia suficientes para mantener un nivel reducido de actividad del complemento en el paciente para tratar de ese modo la enfermedad.

65 En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar la enfermedad de Degos, comprendiendo el método: identificar a un paciente que está, o que probablemente está, aquejado de enfermedad de Degos; y

administrar al paciente un inhibidor del complemento en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar o prevenir (por ejemplo, prevenir la aparición de enfermedad de Degos o prevenir la progresión de la forma cutánea benigna de enfermedad de Degos a una forma más avanzada, multiorgánica y/o sistémica de la enfermedad). El método incluye administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor del complemento en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la enfermedad. En algunas realizaciones, el inhibidor puede administrarse de forma crónica en una cantidad y con una frecuencia para mantener un nivel reducido de activación del complemento en la sangre del paciente mientras dure el tratamiento.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la enfermedad de Degos está asociada con una infección por parvovirus B 19 o por infección por virus de la inmunodeficiencia humana. En algunas realizaciones, la enfermedad de Degos es idiopática.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la enfermedad de Degos afecta patológicamente a uno o más del tracto gastrointestinal, al sistema nervioso central y al sistema cardiovascular. En algunas realizaciones, la enfermedad de Degos es enfermedad de Degos sistémica, multiorgánica. En algunas realizaciones, la enfermedad de Degos es una forma cutánea de la enfermedad.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, la enfermedad de Degos es refractaria a al menos una terapia seleccionada del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un anticoagulante, un antitrombótico e inmunoglobulina intravenosa. El fármaco antiinflamatorio puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en corticosteroides, fenilbutazona, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, tacrolimus y micofenolato de mofetilo. El anticoagulante o antitrombótico puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en clopidogrel, aspirina, y dipiridamol.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el inhibidor del complemento puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido, un análogo polipeptídico, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico y una molécula pequeña. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en CR1 soluble, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor del veneno de cobra, FUT-175, complestatina, y K76 COOH.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el inhibidor del complemento inhibe la expresión de una proteína humana componente del complemento. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento puede inhibir la actividad de una proteína del complemento tal como, aunque sin limitación, el componente C1s del complemento, el componente C1r del complemento, la C3 convertasa, la C5 convertasa o C5b-9.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el inhibidor del complemento inhibe la escisión del componente humano del complemento C5, C4, C3, o C2. Por ejemplo, un inhibidor del complemento puede inhibir la escisión del componente del complemento C5 en los fragmentos C5a y C5b.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína humana componente del complemento (por ejemplo, una proteína C5). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la cadena alfa de la proteína C5. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la cadena beta de C5. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a la cadena alfa del componente del complemento C5 humano, y donde el anticuerpo (i) inhibe la activación del complemento en un fluido corporal humano, (ii) inhibe la unión del componente del complemento humano C5 purificado al componente del complemento humano C3b o al componente del complemento humano C4b, y (iii) no se une al producto de activación del complemento humano libre C5a. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a la proteína humana componente del complemento C5 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-26. En algunas realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al fragmento de C5b del componente del complemento C5.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humano desimmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, el inhibidor del complemento es eculizumab o pexelizumab.

En otro aspecto más, la descripción caracteriza un artículo de fabricación, que contiene: un recipiente que comprende una etiqueta; y una composición que comprende un inhibidor del complemento, donde la etiqueta indica que la composición es para administrarse a un ser humano que tiene, es sospechoso de tener, o está en riesgo de

desarrollar, la enfermedad de Degos. El inhibidor puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína humana del componente C5 del complemento. El inhibidor puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un fragmento de la proteína humana del componente C5 del complemento tal como C5a o C5b.

5 En algunas realizaciones, el artículo de fabricación incluye uno o más agentes activos adicionales tales como, aunque sin limitación, uno o más agentes antiinflamatorios, anticoagulantes o agentes antitrombóticos.

10 El inventor también descubrió que el paciente con enfermedad de Degos descrito en este documento tenía niveles elevados de interferón alfa en suero, así como en el tejido cutáneo biopsiado. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna o a mecanismo de acción, como el interferón alfa regula positivamente la inmunidad adaptativa e innata, potenciando los efectos de cualquier desencadenante antigénico, y se ha informado de que la administración de interferón alfa exógeno es una causa de trombosis y ulceración cutánea, el inventor cree que inhibir el interferón alfa es una estrategia útil para tratar la enfermedad de Degos.

15 Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos, comprendiendo el método administrar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos un inhibidor de interferón alfa en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad.

20 En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos, comprendiendo el método administrar de forma crónica a un paciente aquejado de enfermedad de Degos un inhibidor de interferón alfa en una cantidad y con una frecuencia suficiente para mantener un nivel reducido de actividad interferón alfa en el paciente para tratar de ese modo la enfermedad.

25 En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar la enfermedad de Degos, que incluye el método: identificar a un paciente que está, o probablemente está, aquejado de enfermedad de Degos; y administrar al paciente un inhibidor de interferón alfa en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad.

30 En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar o prevenir (por ejemplo, prevenir la aparición de enfermedad de Degos o prevenir la progresión de la forma cutánea benigna de enfermedad de Degos a una forma más avanzada, multiorgánica y/o sistema de la enfermedad. El método incluye administrar a un paciente que lo necesite un inhibidor de interferón alfa en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la enfermedad. En algunas realizaciones, el inhibidor puede administrarse de forma crónica en una cantidad y con una frecuencia para mantener un nivel reducido de expresión o actividad de interferón alfa en la sangre del paciente mientras dure el tratamiento.

35 En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido, un análogo polipeptídico, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico y una molécula pequeña. El inhibidor puede inhibir, por ejemplo, la expresión de interferón alfa o un receptor de interferón alfa por una célula. El inhibidor puede inhibir, por ejemplo, la actividad de interferón alfa o una proteína receptora de interferón alfa.

40 En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa se une a interferón alfa. En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa se une a un receptor de interferón alfa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa es un anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une a interferón alfa o a un receptor de interferón alfa. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un díacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humano desinmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.

45 En otro aspecto más, la descripción caracteriza a un artículo de fabricación que contiene: un recipiente que comprende una etiqueta; y una composición que comprende un inhibidor de interferón alfa, donde la etiqueta indica que la composición es para administrarse a un ser humano que tiene, es sospechoso de tener, o está en riesgo de desarrollar, enfermedad de Degos. El inhibidor de interferón alfa puede ser, por ejemplo, cualquier inhibidor de interferón alfa descrito en este documento tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a interferón alfa o a un receptor de interferón.

50 En algunas realizaciones, el artículo de fabricación incluye uno o más agentes activos adicionales tales como, aunque sin limitación, un agente antiinflamatorio, un anticoagulante o un agente antitrombótico.

60 En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento pueden incluir la administración (como un agente único o en combinación con un inhibidor del complemento y/o un inhibidor de interferón alfa) de una terapia dirigida a células B. Por ejemplo, la descripción caracteriza un método para tratar o prevenir la enfermedad de Degos, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene, es sospechoso de tener, o está en riesgo de desarrollar, enfermedad de Degos, una cantidad terapéuticamente eficaz de una terapia dirigida a células B. La

terapia dirigida a células B puede ser, por ejemplo, un agente de unión anti-CD20 tal como, aunque sin limitación, anticuerpos anti-CD20. Los anticuerpos anti-CD20 terapéuticos ejemplares, que están aprobados para uso clínico o estén en desarrollo clínico, que pueden usarse en los métodos descritos en este documento incluyen, sin limitación, rituximab (Biogen Idec), ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Biogen Idec), ¹³¹I-tositumomab (GlaxoSmithKline), ofatumumab (Genmab), TRU-015 (Trubion), veltuzumab (IMMU-106; Immunomedics), ocrelizumab (Roche), y AME-133v (Applied Molecular Evolution). Véase, por ejemplo, Levene et al., (2005), *supra*; Burge et al., (2008) Clin Ther 30(0):1806-1816; Kausar et al., (2009) Expert Opin Biol Ther 9(7):889-895; Morschhauser et al., (2009) J Clin Oncol 27(20):3346-3353; y Milani y Castillo (2009) Curr Opin Mol Ther 11(2):200-207.

En otro ejemplo, cualquiera de los métodos descritos en este documento, por ejemplo, métodos en que se administra un inhibidor del complemento y/o un inhibidor de interferón alfa a un paciente con enfermedad de Degos, los métodos también pueden incluir administrar una terapia dirigida a células B tal como un anticuerpo anti-CD20.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable y significan cualquier cadena con enlaces peptídicos de aminoácidos, independientemente de la longitud o la modificación post-traducciona. Las proteínas componentes del complemento descritas en este documento (por ejemplo, proteínas componentes del complemento C2, C3, C4 o C5) pueden contener o ser proteínas de tipo silvestre o pueden ser variantes que tienen no más de 50 (por ejemplo, no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 50) sustituciones conservativas de aminoácido. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Las proteínas humanas componentes del complemento descritas en este documento también incluyen "fragmentos peptídicos antigénicos" de las proteínas, que son más cortos que las proteínas inmaduras de longitud completa (prepro), pero retienen al menos el 10 % (por ejemplo, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 %, o el 100 % o más) de la capacidad de la proteína de longitud completa de inducir una respuesta antigénica en un mamífero. Por ejemplo, un fragmento peptídico antigénico de la proteína C5 puede ser cualquier fragmento de la proteína, que sea menor que la proteína inmadura de longitud completa y retenga al menos el 10 % de la capacidad de la proteína de longitud completa de inducir una respuesta antigénica en un mamífero. Los fragmentos peptídicos antigénicos de una proteína componente del complemento incluyen variantes de delección terminal y también interna de la proteína. Las variantes de delección pueden carecer de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 segmentos de aminoácidos (de dos o más aminoácidos) o aminoácidos individuales no contiguos. Los fragmentos peptídicos antigénicos pueden ser de al menos 6 (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, o 600 o más) restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, al menos 6 restos contiguos de aminoácido en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11). En algunas realizaciones, un fragmento peptídico antigénico de una proteína humana componente del complemento es de menos de 500 (por ejemplo, menos de 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, o 7) restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, menos de 500 restos contiguos de aminoácido en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11). En algunas realizaciones, un fragmento peptídico antigénico de una proteína humana inmadura de longitud completa componente del complemento (proteína prepro-C5) es de al menos 6, pero menos de 500, restos de aminoácido de longitud.

En algunas realizaciones, la proteína humana componente del complemento C5 puede tener una secuencia de aminoácidos que es, o es más de, un 70 (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100) % idéntica a la proteína C5 humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1.

El porcentaje (%) e identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación, con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia, 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, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando pueden determinarse por métodos conocidos.

Las secuencias de aminoácidos para proteínas C5 humanas ejemplares, así como fragmentos peptídicos antigénicos de las mismas son conocidas en la técnica y se exponen a continuación.

Como se usa durante toda la presente descripción, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de anticuerpo completo o intacto (por ejemplo, IgM, IgG, IgA, IgD, o IgE) que se genera por uno cualquiera de una diversidad de métodos que son conocidos en la técnica y se describen en este documento. El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano desimmunizado y un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo puede prepararse y obtenerse de cualquiera de una diversidad de especies, por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos o chimpancés), caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, cobayas, gerbos, hámsteres, ratas y ratones). El anticuerpo puede ser un anticuerpo purificado o uno recombinante.

Como se usa en este documento, la expresión "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno" o expresiones similares se refieren a un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse a un antígeno (por ejemplo, una proteína componente del complemento C5), por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂. Un fragmento scFv es una única cadena polipeptídica que incluye ambas regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo del que se obtiene el scFv. Además, pueden incorporarse diacuerpos (Poljak (1994) Structure 2(12): 1121-1123; Hudson et al., (1999) J Immunol Methods 23(1-2):177-189, cuyas descripciones de ambos se incorpora en este documento por referencia en su totalidad) e intracuerpos (Huston et al., (2001) Hum. Antibodies 10(3-4):127-142; Wheeler et al., (2003) Mol Ther 8(3):355-366; Stocks (2004) Drug Discov Today 9(22): 960-966, cuyas descripciones de ambos se incorpora en este documento por referencia en su totalidad) que se unen a una proteína componente del complemento (por ejemplo, componente C5 del complemento) en las composiciones, y usarse en los métodos descritos en este documento.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta descripción. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones. Los métodos y materiales preferidos se describen a continuación, aunque también pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o el ensayo de los métodos y composiciones actualmente descritos.

Otras características y ventajas de la presente descripción, por ejemplo, métodos para tratar o prevenir la enfermedad de Degos, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos y a partir de las reivindicaciones, que definen el alcance de la invención.

Descripción detallada

La presente descripción proporciona composiciones que contienen un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo que se une a una proteína humana componente del complemento C5) y métodos para usar las composiciones para tratar o prevenir la enfermedad de Degos. Aunque no pretenden ser de ningún modo limitantes, se elaboran composiciones ejemplares (por ejemplo, composiciones farmacéuticas y formulaciones) y métodos para usar las composiciones a continuación y se ejemplifican en los ejemplos de trabajo.

La ruta del complemento

El sistema del complemento actúa junto con otros sistemas inmunológicos del organismo para defenderse contra la intrusión de patógenos celulares y víricos. Existen al menos 25 proteínas del complemento, que se encuentran como un conjunto complejo de proteínas plasmáticas y cofactores de membrana. Las proteínas plasmáticas componen aproximadamente el 10 % de las globulinas en el suero de vertebrados. Los componentes del complemento consiguen sus funciones defensivas inmunitarias interactuando en una serie de eventos intrincados pero precisos de escisión enzimática y unión a membrana. La cascada resultante del complemento conduce a la producción de productos con funciones opsónicas, inmunorreguladoras y líticas. Se proporciona un resumen conciso de las actividades biológicas asociadas con la activación del complemento, por ejemplo, en The Merck Manual, 16ª Edición.

La cascada del complemento progresa a través de la ruta clásica, de la ruta alternativa o de la ruta de lectina. Estas rutas comparten muchos componentes, y aunque difieren en sus etapas iniciales, convergen y comparten los mismos componentes "terminales del complemento" (C5 a C9) responsables de la activación y destrucción de células diana.

La ruta clásica del complemento típicamente se inicia por el reconocimiento por anticuerpos de, y unión a, un sitio antigénico en una célula diana. La ruta alternativa puede ser independiente de anticuerpos, y puede iniciarse por ciertas moléculas sobre superficies de patógenos. Adicionalmente, la ruta de lectina se inicia típicamente con la unión de lectina de unión a manosa (MBL) a sustratos de alto contenido de manosa. Estas rutas convergen en el punto donde el componente C3 del complemento se escinde por una proteasa activa (que es diferente en cada ruta) para producir C3a y C3b. Otras rutas que activan el ataque por el complemento pueden actuar posteriormente en la secuencia de eventos conduciendo a diversos aspectos de la función del complemento.

- 5 C3a es una anafilotoxina. C3b se une a células bacterianas y a otras células, así como a ciertos virus y complejos inmunitarios, y los marca para su eliminación de la circulación. (C3b en este papel se conoce como opsonina). La función opsonica de C3b generalmente se considera que es la acción antiinfecciosa más importante del sistema del complemento. Los pacientes con lesiones crónicas que bloquean la función de C3b son propensos a infección por una amplia diversidad de organismos patogénicos, mientras que pacientes con lesiones posteriores en la secuencia de la cascada del complemento, es decir, pacientes con lesiones que bloquean las funciones de C5, se encuentra que son más propensos solamente a infección por *Neisseria*, y entonces son solamente algo más propensos.
- 10 C3b también forma un complejo con otros componentes únicos para cada ruta para formar la C5 convertasa clásica o alternativa, que escinde C5 en C5a y C5b. C3, por tanto, se considera como la proteína central en la secuencia de reacción del complemento ya que es esencial para la ruta tanto alternativa como clásica. Esta propiedad de C3b está regulada por la proteasa sérica Factor I, que actúa sobre C3b para producir iC3b. Aunque aún es funcional como opsonina, iC3b no puede formar una C5 convertasa activa.
- 15 C5 es una beta globulina de 190 kDa encontrada en suero normal a una concentración de aproximadamente 75 µg/ml (0,4 µM). C5 está glucosilada, con aproximadamente un 1,5 a un 3 por ciento de su masa atribuida a carbohidrato. C5 madura es un heterodímero de una cadena alfa de 115 kDa de 999 aminoácidos que está unida por disulfuro a una cadena beta de 75 kDa de 655 aminoácidos. C5 se sintetiza como un único producto proteico precursor de una única cadena de un gen de una única copia (Haviland et al., (1991) J Immunol 146:362-368). La secuencia de ADN del transcrito de este gen predice un precursor pro-C5 secretado de 1658 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245).
- 20 El precursor pro-C5 se escinde después de los aminoácidos 655 y 659, para producir la cadena beta como un fragmento aminoterminal (restos de aminoácido +1 a 655 de la secuencia anterior) y la cadena alfa como un fragmento carboxilo terminal (restos de aminoácidos 660 a 1658 de la secuencia anterior), con cuatro aminoácidos (restos de aminoácidos 656-659 de la secuencia anterior) delecionados entre los dos.
- 25 C5a se escinde de la cadena alfa de C5 por la C5 convertasa alternativa o clásica como un fragmento aminoterminal que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, los restos de aminoácidos 660-733 de la secuencia anterior). Aproximadamente el 20 % de la masa de 11 kDa de C5a se atribuye a carbohidrato. El sitio de escisión para la acción convertasa está en, o inmediatamente a, el resto de aminoácido 733 de la secuencia anterior. Un compuesto que se uniría a, o adyacente a, este sitio de escisión tendría el potencial de bloquear el acceso de las enzimas C5 convertasa al sitio de escisión y de ese modo actuar como un inhibidor del complemento.
- 30 C5 también puede activarse por medios diferentes de actividad C5 convertasa. La digestión limitada con tripsina (véase, por ejemplo, Minta y Man (1997) J Immunol 119:1597-1602 y Wetsel y Kolb (1982) J Immunol 128:2209-2216) y el tratamiento ácido (Yamamoto y Gewurz (1978) J Immunol 120:2008 y Damerou et al., (1989) Molec Immunol 26:1133-1142) también pueden escindir C5 y producir C5b activo.
- 35 La escisión de C5 libera C5a, una potente anafilotoxina y factor quimiotáctico, y conduce a la formación del complejo del complemento terminal lítico, C5b-9. C5a y C5b-9 también tienen propiedades activadoras de células pleiotrópicas, amplificando la liberación de factores inflamatorios corriente abajo, tales como enzimas hidrolíticas, especies reactivas de oxígeno, metabolitos de ácido araquidónico y diversas citoquinas.
- 40 C5b combina con C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Tras la unión de varias moléculas C9, se forma el complejo de ataque a membrana (MAC, C5b-9, complejo del complemento terminal--TCC). Cuando se insertan suficientes cantidades de MAC en membranas de células diana, las aberturas que crean (poros MAC) median la rápida lisis osmótica de las células diana. Concentraciones no líticas inferiores de MAC pueden producir otros efectos. En particular, la inserción en membrana de pequeñas cantidades de los complejos C5b-9 en células endoteliales y plaquetas puede causar activación celular perjudicial. En algunos casos, la activación puede preceder a la lisis celular.
- 45 Como se ha mencionado anteriormente, C3a y C5a son anafilotoxinas. Estos componentes activados del complemento pueden desencadenar la desgranulación de mastocitos, que liberan histaminas de vasófilos y mastocitos, y otros mediadores de la inflamación, provocando contracción del músculo liso, permeabilidad muscular aumentada, activación de leucocitos y otros fenómenos inflamatorios incluyendo proliferación celular que provoca hiperplasia. C5a también funciona como péptido quimiotáctico que sirve para atraer granulocitos pro-inflamatorios al sitio de activación del complemento.
- 50 Se encuentran receptores de C5a sobre las superficies de células epiteliales y alveolares y de células bronquiales de músculo liso. Los receptores de C5a también se han encontrado en eosinófilos, mastocitos, monocitos, neutrófilos y linfocitos activados.
- 55
- 60

Composiciones

Las composiciones descritas en este documento pueden contener un inhibidor del complemento humano. Cualquier compuesto que se una a o bloquee de otro modo la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes del complemento humano pueden utilizarse de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, un inhibidor del complemento puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, un péptido mimético o una macromolécula que no es un ácido nucleico o una proteína. Estos agentes incluyen, aunque sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros de ARN, aptámeros de L-ARN, espejélmeros, compuestos antisentido, ARN bicatenario, ARN interferente pequeño, inhibidores de ácido nucleico bloqueado e inhibidores de ácido peptidonucleico. En algunas realizaciones, un inhibidor del complemento puede ser una proteína o un fragmento de proteína.

En algunas realizaciones, las composiciones contienen anticuerpos específicos para un componente del complemento humano. Algunos compuestos incluyen anticuerpos dirigidos contra los componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5 (o un fragmento de los mismos; véase a continuación), C6, C7, C8, C9, Factor D, Factor B, Factor P, MBL, MASP-1 o MASP-2, evitando de ese modo la generación de la actividad anafilotóxica asociada con C5a y/o evitando el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC) asociado con C5b. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento inhibe la actividad y/o el ensamblaje del complejo C5b-9. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a uno de C6, C7, C8, C9 o C5b para evitar de ese modo el ensamblaje y/o la actividad del MAC.

Las composiciones también pueden contener formas de origen natural o solubles de compuestos inhibidores del complemento tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor del veneno de cobra, FUT-175, complestatina, y K76 COOH. Otros compuestos que pueden utilizarse para unirse a o bloquear de otro modo la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes del complemento humano incluyen, aunque sin limitación, proteínas, fragmentos de proteína, péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros de ARN incluyendo ARC 187 (que está disponible en el mercado en Archemix Corporation, Cambridge, MA), aptámeros de L-ARN, espejélmeros, compuestos antisentido, inhibidores de serina proteasa, moléculas que pueden utilizarse en interferencia de ARN (iARN) tales como ARN bicatenario incluyendo ARN interferente pequeño (ARNip), inhibidores de ácido nucleico bloqueado (LNA), inhibidores de ácido peptidonucleico (PNA), etc.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento inhibe la activación del complemento. Por ejemplo, el inhibidor del complemento puede unirse a e inhibir la actividad de activación del complemento de C1 (por ejemplo, C1q, C1r o C1s) o el inhibidor del complemento puede unirse a e inhibir (por ejemplo, inhibir la escisión de) C2, C3 o C4. En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe la formación o ensamblaje de la C3 convertasa y/o C5 convertasa de las rutas alternativa y/o clásica del complemento. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento inhibe la formación del complemento terminal, por ejemplo, la formación del complejo de ataque a la membrana C5b-9. Por ejemplo, un inhibidor del complemento de anticuerpo puede incluir un anticuerpo anti-C5. Dichos anticuerpos anti-C5 pueden interactuar directamente con C5 y/o C5b, para inhibir la formación de y/o la función fisiológica de C5b.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en este documento pueden contener un inhibidor del componente humano del complemento C5 (por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína humana componente del complemento C5 o a un fragmento biológicamente activo de la misma tal como C5a o C5b. Como se usa en este documento, un "inhibidor del componente C5 del complemento" es cualquier agente que inhibe: (i) la expresión, o tráfico o secreción intracelular apropiada por una célula, de una proteína componente del complemento C5; (ii) la actividad de los fragmentos de escisión de C5, C5a o C5b (por ejemplo, la unión de C5a a sus receptores celulares afines o la unión de C5b a C6 y/o a otros componentes del complejo del complemento terminal; véase anteriormente); (iii) la escisión de la proteína humana C5 para formar C5a y C5b; o (iv) el tráfico intracelular apropiado de, o secreción por una célula, de una proteína componente C5 del complemento. La inhibición de la expresión de la proteína componente C5 del complemento incluye: inhibición de la transcripción de un gen que codifica una proteína C5 humana; degradación aumentada de un ARNm que codifica una proteína C5 humana; inhibición de la traducción de un ARNm que codifica una proteína C5 humana; degradación aumentada de una proteína C5 humana; inhibición del procesamiento apropiado de una prepro proteína C5 humana; o inhibición del tráfico apropiado o secreción por una célula de una proteína C5 humana. Los métodos para determinar si un agente candidato es un inhibidor del componente C5 del complemento humano son conocidos en la técnica y se describen en este documento.

Un inhibidor del componente C5 del complemento humano puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido, un análogo polipeptídico, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.

"Molécula pequeña" como se usa en este documento, se entiende que se refiere a un agente, que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 6 kDa y mucho más preferiblemente de menos de aproximadamente 2,5 kDa. Muchas empresas farmacéuticas tienen amplias bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas que comprenden series de moléculas pequeñas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o algáceos, que pueden explorarse con cualquiera de los ensayos de la solicitud. Esta solicitud contempla el uso, entre otras cosas, de bibliotecas químicas pequeñas, bibliotecas de péptidos o colecciones de productos naturales. Tan et al., describe

una biblioteca con más de dos millones de compuestos sintéticos que es compatible con ensayos basados en células en miniatura (J Am Chem Soc (1998) 120:8565-8566). Pertenece al alcance de esta descripción que dicha biblioteca pueda usarse para explorar inhibidores del componente C5 del complemento humano. Existen numerosas bibliotecas de compuestos disponibles en el mercado, tales como Chembridge DIVERSet. También están disponibles bibliotecas de investigadores académicos, tales como el conjunto Diversity del programa de desarrollo de agentes terapéuticos NCI. También puede emplearse el diseño racional de fármacos. Por ejemplo, el diseño racional de fármacos puede emplear el uso de información de estructura cristalina o en solución sobre la proteína humana componente C5 del complemento. Véanse, por ejemplo, las estructuras descritas en Hagemann et al., (2008) J Biol Chem 283(12):7763-75 y Zuiderweg et al., (1989) Biochemistry 28(1):172-85. El diseño racional de fármacos también puede conseguirse basándose en compuestos conocidos, por ejemplo, un inhibidor conocido de C5 (por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína humana componente C5 del complemento).

Los peptidomiméticos pueden ser compuestos en que al menos una parte de un polipéptido objeto se modifica, y la estructura tridimensional del péptido mimético permanece sustancialmente igual a la del polipéptido objeto. Los peptidomiméticos pueden ser análogos de un polipéptido objeto de la descripción que son, en sí mismos, polipéptidos que contienen una o más sustituciones u otras modificaciones dentro de la secuencia polipeptídica objeto. Como alternativa, al menos una parte de la secuencia polipeptídica objeto puede remplazarse con una estructura no peptídica, de modo que la estructura tridimensional del polipéptido objeto se retenga sustancialmente. En otras palabras, uno, dos o tres restos de aminoácido dentro de la secuencia polipeptídica objeto pueden remplazarse por una estructura no peptídica. Además, otras partes peptídicas del polipéptido objeto pueden remplazarse, pero no necesariamente, con una estructura no peptídica. Los peptidomiméticos (análogos tanto peptídicos como no peptídicos) pueden tener propiedades mejoradas (por ejemplo, proteólisis disminuida, retención aumentada o biodisponibilidad aumentada). Los peptidomiméticos generalmente tienen disponibilidad oral mejorada, que les hace especialmente adecuados para el tratamiento de trastornos en un ser humano o un animal. Debe apreciarse que los peptidomiméticos pueden tener o no estructuras químicas tridimensionales similares, pero comparten características estructurales tridimensionales y geometría comunes. Cada peptidomimético puede tener adicionalmente uno o más elementos de unión adicionales únicos.

Pueden usarse inhibidores de ácido nucleico para disminuir la expresión de un gen endógeno, por ejemplo, un gen que codifica el componente C5 del complemento humano. El antagonista de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ARNip, ARNbc, una ribozima, una formación de triple hélice, un aptámero o un ácido nucleico antisentido. Los ARNip son ARN bicatenarios (ARNbc) pequeños que opcionalmente incluyen salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNip es de aproximadamente de 18 a 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. Las secuencias de ARNip pueden ser, en algunas realizaciones, exactamente complementarias al ARNm diana. Los ARNbc y los ARNip, en particular, pueden usarse para silenciar la expresión génica en células de mamífero (por ejemplo, células humanas). Véase, por ejemplo, Clemens et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:6499-6503; Billy et al., (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:14428-14433; Elbashir et al., (2001) Nature 411:494-8; Yang et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030166282, 20030143204, 20040038278 y 20030224432. Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleótidos), por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas), y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos antisentido pueden incluir un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no tiene que ser 100 % complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para poder hibridar específicamente. Un oligonucleótido puede hibridar específicamente cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para causar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en que se realizan los ensayos. La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm (por ejemplo, un ARNm que codifica una proteína C5 humana) puede interferir con una o más de las funciones normales de ARNm. Las funciones de ARNm a interferirse incluyen todas las funciones clave tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, traducción de la proteína a partir del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acometerse por ARN. La unión de una o más proteínas específicas al ARN también puede interferirse por hibridación de oligonucleótido antisentido con el ARN. Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o de ARN que hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, por ejemplo, el ARNm que codifica una proteína humana componente C5 del complemento. La región complementaria puede extenderse entre aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas.

Las nucleobases modificadas pueden incluir, por ejemplo, pirimidinas 5-sustituidas tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina y C₅-propinil pirimidinas tales como C₅-propinilcitosina y C₅-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen, por ejemplo, 8-aza-7-deszapurinas-7-sustituidas y 7-deszapurinas-7-sustituidas

tales como, por ejemplo, 7-yodo-7-desazapurinas, 7-ciano-7-desazapurinas, 7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Ejemplos de estos incluyen 6-amino-7-yodo-7-desazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-desazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-desazapurinas y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.987.071; 5.116.742; y 5.093.246; "Antisense RNA and DNA," D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Haselhoff y Gerlach (1988) Nature 334:585-59; Helene, C. (1991) Anticancer Drug D 6:569-84; Helene (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; y Maher (1992) Bioassays 14:807-15.

Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas cortas que pueden usarse para reconocer y unirse específicamente a casi cualquier molécula, incluyendo proteínas de superficie celular. La evolución sistemática de los ligandos por el proceso de enriquecimiento exponencial (SELEX) es poderosa y puede usarse para identificar fácilmente dichos aptámeros. Los aptámeros pueden prepararse para una amplia gama de proteínas de importancia para terapia y diagnóstico, tales como factores de crecimiento y antígenos de superficie celular. Estos oligonucleótidos se unen a sus dianas con afinidades y especificidades similares a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Ulrich (2006) Handb Exp Pharmacol 173:305-326.

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 humano es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína humana componente C5 del complemento. (A partir de ahora, el anticuerpo puede mencionarse a veces como un "anticuerpo anti-C5").

En algunas realizaciones, anti-C5 se une a un epítipo en la proteína precursora humana pro-C5. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo en la proteína humana componente C5 del complemento que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1 (N.º de acceso del NCBI AAA51925 y Haviland et al., *supra*).

Un "epítipo" se refiere al sitio en una proteína (por ejemplo, una proteína humana componente C5 del complemento) que se une por un anticuerpo. "Epítipos solapantes" incluyen al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) resto común de aminoácido.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 se une a un epítipo en la proteína precursora pro-C5 humana que carece de la secuencia líder. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo en la proteína humana componente C5 del complemento que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 2, que es una proteína C5 humana que carece de la secuencia líder aminoterminal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo en la cadena alfa de la proteína humana componente C5 del complemento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo dentro, o solapando con, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 3, que es la proteína de cadena alfa del componente C5 del complemento humano. Los anticuerpos que se unen a la cadena alfa de C5 se describen en, por ejemplo, Ames et al., (1994) J Immunol 152:4572-4581.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo en cadena beta de la proteína humana componente C5 del complemento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo dentro, o solapando con, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 4, que es la proteína de cadena beta del componente C5 del complemento humano. Los anticuerpos que se unen a la cadena beta de C5 se describen en, por ejemplo, Moongkarndi et al., (1982) Immunobiol 162:397; Moongkarndi et al., (1983) Immunobiol 165:323; y Mollnes et al., (1988) Scand J Immunol 28:307-312.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo dentro, o solapando con, un fragmento peptídico antigénico de una proteína humana componente C5 del complemento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo dentro, o solapando con, un fragmento peptídico antigénico de una proteína humana componente C5 del complemento, conteniendo el fragmento, o consistiendo en, la siguiente secuencia de aminoácidos: VIDHQGTKSSKCVRQKVEGSS (SEQ ID NO: 5) o KSSKC (SEQ ID NO: 6).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede unirse a un epítipo dentro, o solapando con, un fragmento de una proteína humana componente C5 del complemento, conteniendo el fragmento, o consistiendo en, una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos (que son fragmentos antigénicos ejemplares de la SEQ ID NO: 1):

NFSLETWFGKEILVKTLRVVPEGVKRESYSGVTLDPKGIYGTISRKKEFPYRIP
LDLVPKTEIKRILSVKGLLVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAEELMSVVPVF
YVFHYLETGNHWNIFHSD (SEQ ID NO:7);

SESPVIDHQGTKSSKCVRQKVEGSSSHLVTFTVLPLEIGHLHNINFSLETWFGKEI
 LVKTLRVVPEGVKRESYSGVTLDPKGIYGTISRKKEFPYRIPLDLVPKTEIKRIL
 SVKGLLVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAELMSVVPVFYVFHYLETGNH
 WNIFHSDPLIEKQKLLKLLKEGMLSIMSRYNADYSYS (SEQ ID NO:8);

SHKDMQLGRLHMKTLIPVSKPEIRSYFPES (SEQ ID NO: 9);

SHKDMQLGRLHMKTLIPVSKPEIRSYFPESWLWEVHLVPRRKQLQFALPDSL
 TTWEIQGIGISNTGICVADTVKAKVFKDVFLEMNIPYSVVRGEIQKLGTVYN
 YRTSGMQFCVKMSAVEGICTSESPVIDHQGTKSSKCVRQKVEGSSSHLVTFTV
 LPLEIGHLHNINFSLETWFGKEILVKTLRVVPEGVKRESYSGVTLDPKGIYGTISR
 RKEFPYRIPLDLVPKTEIKRILSVKGLLVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAE
 LMSVVPVFYVFHYLETGNHWNIFHSDPLIEKQKLLKLLKEGMLSIMSRYNAD
 YSYS (SEQ ID NO:10); y DHQGTKSSKCVRQKVEG (SEQ ID NO:11).

5

Fragmentos antigénicos ejemplares adicionales del componente C5 del complemento humano se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 se une específicamente a una proteína humana componente C5 del complemento (por ejemplo, la proteína C5 humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1). Los términos "unión específica" o "se une específicamente" se refieren a dos moléculas que forman un complejo (por ejemplo, un complejo entre un anticuerpo y una proteína del componente C5 del complemento) que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de asociación (K_a) es mayor de 10^6 M^{-1} . Por tanto, un anticuerpo puede unirse específicamente a una proteína C5 con una K_a de al menos (o mayor de) 10^6 (por ejemplo, al menos o mayor de 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , o 10^{15} o mayor) M^{-1} . Ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a una proteína humana componente C5 del complemento se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

20 Los métodos para determinar si un anticuerpo se une a un antígeno proteico y/o la afinidad de un anticuerpo para un antígeno proteico son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión de un anticuerpo a un antígeno proteico puede detectarse y/o cuantificarse usando una diversidad de técnicas tales como, aunque sin limitación, transferencia de Western, dot blot, método de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, sistema BIAcore; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.), o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols," Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide," W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering," 2ª Edición, Oxford University Press, NY, Oxford; Johnne et al., (1993) J Immunol Meth 160:191-198; Jonsson et al., (1993) Ann Biol Clin 51:19-26; y Jonsson et al., (1991) Biotechniques 11:620-627. Véase también la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede bloquear de forma cruzada la unión de otro anticuerpo que se une a un epítipo dentro, o solapando con, una proteína humana componente C5 del complemento. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-C5 puede bloquear de forma cruzada la unión de un anticuerpo que se une a un epítipo dentro, o solapando con, un fragmento peptídico de una proteína humana componente C5 del complemento. El fragmento peptídico puede ser un fragmento de una proteína humana componente C5 del complemento que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11. Por ejemplo, el fragmento peptídico puede contener, o consistir en, la siguiente secuencia de aminoácidos: VIDHQGTKSSKCVRQKVEGSS (SEQ ID NO: 5).

40 Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo de bloqueo cruzado" se refiere a un anticuerpo que disminuye la cantidad de unión del anticuerpo anti-C5 a un epítipo en una proteína del componente C5 del complemento respecto a la cantidad de unión del anticuerpo anti-C5 al epítipo en ausencia del anticuerpo. Los métodos adecuados para determinar si un primer anticuerpo bloquea de forma cruzada la unión de un segundo anticuerpo a un epítipo, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos de bloqueo cruzado pueden identificarse comparando la unión del anticuerpo monoclonal anti-C5 5G1.1 (producido por la línea celular de hibridoma con denominación de la ATCC HB-11625; véase la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245) en presencia y en ausencia de un anticuerpo de ensayo. La unión disminuida del anticuerpo 5G1.1 en presencia del anticuerpo de ensayo en comparación con la unión del anticuerpo 5G1.1 en ausencia del anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo es un anticuerpo de bloqueo cruzado.

50

Los métodos para identificar el epítipo al que se une un anticuerpo particular (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el epítipo de unión de un anticuerpo anti-C5 puede identificarse midiendo la unión del anticuerpo con varios (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, o 30 o más) fragmentos peptídicos solapantes de una proteína del componente C5 del complemento (por ejemplo, 5 varios fragmentos solapantes de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-11). Cada uno de los diferentes péptidos solapantes después se une a una dirección única en un soporte sólido, por ejemplo, pocillos diferentes de una placa de ensayo de múltiples pocillos. A continuación, el anticuerpo anti-C5 se examina poniéndolo en contacto con cada uno de los péptidos en la placa de ensayo durante una cantidad de tiempo y en condiciones que permiten que el anticuerpo se una a su epítipo. El anticuerpo anti-C5 no unido se retira lavando cada uno de los pocillos. A continuación, se pone en contacto un anticuerpo secundario marcado de forma detectable que se une al anticuerpo anti-C5, si está presente en un pocillo de la placa, con cada uno de los pocillos, y se retira el anticuerpo secundario no unido por etapas de lavado. La presencia o cantidad de la señal detectable producida por el anticuerpo secundario marcado de forma detectable en un pocillo es una indicación de que el anticuerpo anti-C5 se une al fragmento peptídico particular asociado con el pocillo. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (*supra*), Benny K. C. Lo (*supra*), y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006015383 6. Un epítipo particular al que se une un anticuerpo también puede identificarse usando técnicas cromatográficas BIAcore (véase, por ejemplo, Pharmacia BIAtechnology Handbook, "Epitope Mapping," Sección 6.3.2, (Mayo de 1994); y Johne et al., (1993) J Immunol Methods 160:20191-8).

Los anticuerpos anti-C5 descritos en este documento pueden tener actividad en el bloqueo de la generación o actividad de los fragmentos activos C5a y/o C5b de una proteína del componente C5 del complemento (por ejemplo, una proteína C5 humana). A través de este efecto de bloqueo, los anticuerpos anti-C5 inhiben, por ejemplo, los efectos pro-inflamatorios de C5a y la generación del complejo de ataque a la membrana (MAC) C5b-9 en la superficie de una célula. Los anticuerpos anti-C5 que tienen la capacidad de bloquear la generación de C5a se describen en, por ejemplo, Moongkarndi et al., (1982) Immunobiol 162:397 y Moongkarndi et al., (1983) Immunobiol 165:323.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-C5, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, puede reducir la capacidad de una proteína C5 de unirse al componente C3 del complemento humano (por ejemplo, C3b presente en un complejo AP o CP C5 convertasa) en más del 50 (por ejemplo, más del 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 o más) %. En algunas realizaciones, tras la unión a una proteína C5, el anticuerpo anti-C5 o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir la capacidad de la proteína C5 de unirse al componente C4b del complemento (por ejemplo, C4b presente en una CP C5 convertasa) en más del 50 (por ejemplo, más del 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 o más) %. Los métodos para determinar si un anticuerpo puede bloquear la generación o la actividad de los fragmentos activos C5a y/o C5b de una proteína componente C5 del complemento, o la unión al componente C4b o C3b del complemento, son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245 y en Wurzner et al., (1991) Complement Inflamm 8:328-340.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-C5 se une a una región aminoterminal de la cadena alfa de una proteína componente C5 del complemento, pero no se une a C5a libre. Los epítipos para un anticuerpo C5 dentro de la región aminoterminal de la cadena alfa incluyen, por ejemplo, epítipos dentro de la secuencia humana VIDHQGTKSSKCVKQVEGSS (SEQ ID NO: 5).

En algunas realizaciones, la composición comprende, y/o el anticuerpo es, eculizumab (Soliris®; Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). (Véase, por ejemplo, Kaplan (2002) Curr Opin Investig Drugs 3(7): 1017-23; Hill (2005) Clin Adv Hematol Oncol 3(11):849-50; y Rother et al., (2007) Nature Biotechnology 25(11):1256-1488.)

En algunas realizaciones, la composición comprende, y/o el anticuerpo es, pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). Véase, por ejemplo, Whiss (2002) Curr Opin Investig Drugs 3(6):870-7; Patel et al., (2005) Drugs Today (Barc) 41(3):165-70; y Thomas et al., (1996) Mol Immunol 33(17-18): 1389-401.

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une a C5a (a veces mencionado en este documento como "un anticuerpo anti-C5a"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a C5a, pero no a C5 de longitud completa. Como se ha analizado anteriormente, la proforma de C5, una proteína precursora de 1676 restos de aminoácido, se procesa por una serie de eventos de escisión proteolítica. Los primeros 18 péptidos (numerados -18 a -1) constituyen un péptido señal que se escinde de la proteína precursora. La proteína restante de 1658 aminoácidos se escinde en dos lugares para formar las cadenas alfa y beta. El primer evento de escisión sucede entre los restos de aminoácidos 655 y 656. La segunda escisión sucede entre los restos de aminoácido 659 a 660. Los dos eventos de escisión producen la formación de tres fragmentos polipeptídicos distintos: (i) un fragmento que comprende los aminoácidos 1 a 655, que se menciona como la cadena beta; (ii) un fragmento que comprende los aminoácidos 660 a 1658, que se menciona como la cadena alfa; y (iii) un fragmento tetrapeptídico que consiste en los aminoácidos 656 a 659. Los fragmentos polipeptídicos de cadena alfa y de cadena beta están conectados entre sí mediante enlace disulfuro y constituyen la proteína C5 madura. La CP o AP C5 convertasa activa C5 maduro escindiendo la cadena alfa entre los restos 733 y 734, que provoca la liberación del fragmento C5a (aminoácidos 660 a 733). La parte restante de C5 maduro es el fragmento C5b, que contiene los restos 734 a 1658 de la cadena alfa unida por disulfuro a la cadena beta.

In vivo, C5a se metaboliza rápidamente por una enzima del suero, la carboxipeptidasa B, en una forma de 73 aminoácidos llamada "C5a des-Arg", que ha perdido el resto carboxiterminal de arginina. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a C5a también se une a C5a desarginado. En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a C5a no se une a C5a desarginado.

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une a un neoepítipo presente en C5a, es decir, un epítipo que queda expuesta tras la liberación de C5a del fragmento de cadena alfa de C5 maduro. Los anticuerpos que se unen a C5a (por ejemplo, un neoepítipo presente en C5a) son conocidos en la técnica así como los métodos para producir dichos anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a C5a puede tener la especificidad de unión de un anticuerpo específico del neoepítipo de C5a descrito en uno cualquiera de, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 01/15731; Ames et al., (1994) *J Immunol* 152(9):4572-4581; Inoue (1989) *Complement Inflamm* 6(3):219-222; y la patente de Estados Unidos n.º 6.866.845. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une a C5a puede tener la especificidad de unión de un anticuerpo específico para el neoepítipo de C5a comercial tal como, aunque sin limitación, sc-52633 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California), 152-1486 (BD Pharmingen/BD Biosciences), ab11877 (Abcam, Cambridge, Massachusetts), y HM2079 (clon 2952; HyCult Biotechnology, Países Bajos). En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a C5a puede bloquear de forma cruzada la unión de cualquiera de los anticuerpos específicos del neoepítipo de C5a mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 puede ser un anticuerpo que se une a una proteína C5a de mamífero (por ejemplo, humana). Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a una proteína C5a humana que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDETCEQRAARISLGRPCIKAFTECCVVASQLRANISHKDMQLGR (SEQ ID NO: 12). El anticuerpo puede unirse a C5a humana en un epítipo dentro o solapando con la secuencia de aminoácidos: CCYDGACVNNDETCEQRAAR (SEQ ID NO: 13); KCCYDGACVNNDETCEQR (SEQ ID NO: 14); VNNDETCEQR (SEQ ID NO: 15); VNNDET (SEQ ID NO: 16); AARISLGR (SEQ ID NO: 17); CCYDGACVNNDETCEQRAA (SEQ ID NO: 18); CCYDGACVNNDETCEQRA (SEQ ID NO: 19); CCYDGACVNNDETCEQR (SEQ ID NO: 20); CCYDGACVNNDETCEQ (SEQ ID NO: 21); CCYDGACVNNDETCE (SEQ ID NO: 22); CYDGACVNNDETCEQRAAR (SEQ ID NO: 23); YDGACVNNDETCEQRAAR (SEQ ID NO: 24); o CYDGACVNNDETCEQRAAR (SEQ ID NO: 25). En algunas realizaciones, un anticuerpo puede unirse a una proteína C5a humana o a un fragmento de la misma que contiene una secuencia de aminoácidos que contiene, o consiste en, al menos cuatro (por ejemplo, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 o más) aminoácidos consecutivos representados en una cualquiera de las SEQ ID NO: 12-25. Los fragmentos adicionales de la proteína C5a a la que puede unirse un anticuerpo descrito en este documento y métodos para generar sitios de combinación de antígeno específico de C5a específicos se exponen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.686.100.

En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo a C5a puede inhibir la actividad biológica de C5a. Los métodos para medir la actividad C5a incluyen, por ejemplo, ensayos de quimiotaxis, RIA o ELISA (véase, por ejemplo, Ward y Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50(3):606-16 y Wurzner et al., (1991) *Complement Inflamm* 8:328-340). En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo a C5a puede inhibir la interacción entre C5a y C5aR1. Los métodos adecuados para detectar y/o medir la interacción entre C5a y C5aR1 (en presencia y en ausencia de un anticuerpo) son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Mary y Boulay (1993) *Eur J Haematol* 51(5):282-287; Kaneko et al., (1995) *Immunology* 86(1):149-154; Giannini et al., (1995) *JBiol Chem* 270(32):19166-19172; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060160726. Por ejemplo, la unión de C5a marcado de forma detectable (por ejemplo, marcado de forma radiactiva) a células mononucleares de sangre periférica que expresan C5aR1 puede evaluarse en presencia y en ausencia de un anticuerpo. Una disminución en la cantidad de C5a marcado de forma detectable que se une a C5R1 en presencia del anticuerpo, en comparación con la cantidad de unión en ausencia del anticuerpo, es una indicación de que el anticuerpo inhibe la interacción entre C5a y C5aR1.

En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo a C5a puede inhibir la interacción entre C5a y C5L2 (véase a continuación). Los métodos para detectar y/o medir la interacción entre C5a y C5L2 son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Ward (2009) *J Mol Med* 87(4):375-378 y Chen et al., (2007) *Nature* 446(7132):203-207 (véase a continuación).

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une a C5b (a veces mencionado en este documento como "un anticuerpo anti-C5b"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a C5b, pero no se une a C5 de longitud completa. La estructura de C5b se describe anteriormente y también se detalla en, por ejemplo, Müller-Eberhard (1985) *Biochem Soc Symp* 50:235-246; Yamamoto y Gewurz (1978) *J Immunol* 120(6):2008-2015; y Haviland et al., (1991), *supra*. Como se ha descrito anteriormente, C5b se combina con C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Los intermedios de complejo proteico formados durante la serie de combinaciones incluyen C5b-6 (incluyendo C5b y C6), C5b-7 (incluyendo C5b, C6 y C7) y C5b-8 (incluyendo C5b, C6, C7 y C8). Tras la unión de varias moléculas C9, se forma el complejo de ataque a la membrana (MAC), complejo del complemento terminal C5b-9 (TCC). Cuando suficientes cantidades de MAC se insertan en las membranas de las células diana, las aberturas que crean (poros MAC) median la rápida lisis osmótica de las células diana.

En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo a C5b puede inhibir la interacción entre C5b y C6. En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo a C5b puede inhibir el ensamblaje o la actividad del MAC-TCC C5b-9. En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo a C5b puede inhibir la lisis celular dependiente del complemento (por ejemplo, *in vitro* y/o *in vivo*). Los métodos adecuados para evaluar si un anticuerpo inhibe la lisis dependiente del complemento incluyen, por ejemplo, ensayos hemolíticos u otros ensayos funcionales para detectar la actividad de C5b-9 soluble. Por ejemplo, una reducción en la capacidad de lisis celular del complemento en presencia de un anticuerpo puede medirse por un ensayo de hemólisis descrito por Kabat y Mayer (eds.), "Experimental Immunology, 2ª Edición," 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de ese ensayo al como el método de hemólisis de eritrocitos de pollo como se describe en, por ejemplo, Hillmen et al., (2004) NEngl J Med 350(6):552.

Los anticuerpos que se unen a C5b, así como los métodos para preparar dichos anticuerpos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245. Los anticuerpos anti-C5b disponibles en el mercado están disponibles de varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Hycult Biotechnology (número de catálogo: HM2080; clon 568) y Abcam™ (ab46151 o ab46168).

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une a una forma de mamífero (por ejemplo, humana) de C5b. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a una parte de una proteína C5b humana que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

20  QEQTYVISAKIFRVGASENIVIQVYGYTEAFDATISIKSYDPDKKFSYSSGHVHL
    SSENKFNQNSAILTIQPKQLPGGQNPVSYVYLEVVSKHFSKSKRMPITYDNGFLF
    IHTDKPVYTPDQSVKVRVYSLNDDLKPAKRETVLTFIDPEGSEVDMVEEIDHI
    GIISFPDFKIPSNPRYGMWTIKAKYKEDFSTTGTAYFEVKEYVLPHFVSIEPEY
25  NFIGYKNFKNFEITIKARYFYNKVVTEADVYITFGIREDLKDDQKEMMQTAM
    QNTMLINGIAQVTFDSETAVKELSYYSLEDLNKNKYLIAVTVIESTGGFSEAE
    IPGIKYVLSPLYKLNVLATPLFLKPGIPYPIKQVQKDSLQDQVGGVPVILNAQTID
    VNQETSDDLDPKSVTRVDDGVASFVNLNLPVSGVTVLEFNVKTDAPDLPEENQA
    REGYRAIAYSSLSQSYLYIDWTDNHKALLVGEHLNIIIVTPKSPYIDKITHYNYL
30  ILSKGGKIIHFGTREKFSASYQSINIPVTQNMVPSRLLVYIYVTGEQTAELVSD
    SVWLNIEEKCGNQLQVHLSPADADAYSPGQTVSLNMATGMDSWVALAAVDS
    AVYGVQRGAKKPLERVFQFLEKSDLGCGAGGGLNANVFHLAGLFTLTAN
    ADDSQENDEPCKEIL (SEQ ID NO: 4).

```

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede unirse a una parte de una proteína C5b humana que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

35  LHMKTLLPVSKPEIRSYFPEWSLWEVHLVPRRKLQFALPDSLTTWEIQGIGIS
    NTGICVADTVKAKVFKDVFLEMNIPYSVVRGEQIQLKGTVYNYRTSGMQFCV
    KMSAVEGICTSESPVIDHQGTKSSKCVKQVEGSSSHLVFTVLPLEIGLHNIN
    FSLETWFGKEILVKTLRVVPEGVKRESYSGVTLDPGRIYGTISRRKEFPYRIPL
40  DLVPKTEIKRILSVKGLLVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAEELMSVVPVYF
    VFHYLETGNHWNIFHSDPLIEKQKLLKGLKEGMLSIMSYRNADYSYVWKG
    GSASTWLTAFALRVLGQVNYVEQNQNSICNLSLLWLVENYQLDNGSFKENS
    QYQPIKLGSTLPVEARENSLYLTAFTVIGIRKAFDICPLVKIDTALIKADNFLE
    NTLPAQSTFTLAIASAYALSGLDKTHPQFRSIVSALKREALVKGPNPIYRFWKD
45  NLQHKDSSVPNTGTARMVETTAYALLTSLNLKDINYVNPVIKWLSEEQRYGG
    GFYSTQDTINAIEGLTEYSLLVKQLRLSMDIDVSYKHKGALHNYKMTDKNFL
    GRPVEVLLNDDLIVSTFGGSLATVHVTTVVHKTSTSEEVCSFYLKIDTQDIEA
    SHYRGYGNSDYKRIVACASYKPSREESSSGSSHAVMDISLPTGISANEEDLKA
    LVEGVDQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSS
50  DFLCVRFRIFELFEVGFSLPATFTVYEHYHRPDKQCTMFYSTSNIQIKVCEGAA
    CKCVEADCGMQEELDLTISAETRKQTACKPEIAYAYKVSITSITVENVFKY
    KATLLDIYKTGEAVAEEKDSEITFIKVTCTNAELVKGRQYLIMGKEALQIKYN
    FSFRYIYPLDSLTIWIEYWPRDTCSSCQAFANLDEFAEDIFLNGC (SEQ ID NO: 26).

```

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede unirse a la proteína C5b humana o a un fragmento de la misma que contiene una secuencia de aminoácidos que contiene, o consiste en, al menos cuatro (por ejemplo, al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más) aminoácidos consecutivos representados en la SEQ ID NO: 4 o en la SEQ ID NO: 26.

Sub-fragmentos ejemplares adicionales de C5b o de C5a humana a la que puede unirse un anticuerpo inhibidor de C5 se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

En algunas realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido C5a (por ejemplo, el polipéptido C5a humano que tiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones, el inhibidor es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido C5b.

Los métodos para determinar si un agente particular es un inhibidor del componente C5 del complemento humano se describen en este documento y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la concentración y/o la actividad

fisiológica de C5a y de C5b en un fluido corporal pueden medirse por métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos para medir la concentración o la actividad de C5a incluyen, por ejemplo, ensayos de quimiotaxis, RIA o ELISA (véase, por ejemplo, Ward y Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50(3):606-16 y Wurzner et al., (1991) *Complement Inflamm* 8:328-340). Para C5b, pueden usarse ensayos hemolíticos o ensayos para C5b-9 soluble como se analiza en este documento. Pueden usarse también otros ensayos conocidos en la técnica. Usando estos ensayos u otros tipos adecuados, pueden explorarse agentes candidatos capaces de inhibir en componente C5 del complemento humano tal como un anticuerpo anti-C5, para identificar, por ejemplo, compuestos que son útiles en los métodos descritos en este documento y para determinar los niveles apropiados de dosificación de dichos compuestos.

Los métodos para detectar la inhibición de la expresión de ARNm o proteína (por ejemplo, inhibición de la expresión de la proteína C5 humana o la expresión de un ARNm que codifica la proteína C5 humana) son bien conocidos en la técnica de biología molecular e incluyen, por ejemplo, transferencia de Northern y técnicas de RT-PCR (o RT-PCR cuantitativa) para ARNm y para la detección de proteínas, transferencia de Western, dot blot o técnicas ELISA. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Los métodos para determinar si un compuesto candidato inhibe la escisión de C5 humano en las formas C5a y C5b son conocidos en la técnica y describen en, por ejemplo, Moongkarndi et al., (1982) *Immunobiol* 162:397; Moongkarndi et al., (1983) *Immunobiol* 165:323; Isenman et al., (1980) *J Immunol* 124(1):326-31; Thomas et al., (1996) *Mol Immunol* 33(17-18): 1389-401; y Evans et al., (1995) *Mol Immunol* 32(16):1183-95.

La inhibición del componente C5 del complemento humano también puede reducir la capacidad de lisis celular del complemento en los fluidos corporales de un sujeto. Dicha reducción de la capacidad de lisis celular del complemento presente pueden medirse por métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, por un ensayo hemolítico convencional tal como el ensayo de hemólisis descrito por Kabat y Mayer (eds), "Experimental Immunochimistry, 2ª Edición," 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de ese ensayo tal como el método de hemólisis de eritrocitos de pollo como se describe en, por ejemplo, Hillmen et al., (2004) *N Engl J Med* 350(6):552.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en este documento pueden contener un inhibidor de interferón alfa. Cualquier compuesto que se una a o bloquee de otro modo la generación y/o la actividad de interferón alfa puede utilizarse de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, un inhibidor de interferón alfa puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip, un ARNbc, una ribozima, una formación de triple hélice, un aptámero), un péptido mimético o una macromolécula que no es un ácido nucleico o una proteína. Estos agentes incluyen, aunque sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros de ARN, aptámeros de L-ARN, espiegélmeros, compuestos antisentido, ARN bicatenario, ARN interferente pequeño, inhibidores de ácido nucleico bloqueado e inhibidores de ácido peptidonucleico. En algunas realizaciones, un inhibidor de interferón alfa puede ser una proteína o un fragmento de la proteína. En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa es un inhibidor del receptor (receptor de interferón alfa) al que se une el interferón alfa. El receptor de interferón alfa humano se describe en, por ejemplo, Novick et al., (1994) *Cell* 77(3):391-400; Chill et al., (2003) *Structure* 11(7):791-802; y Uzé et al., (2007) *Curr Top Microbiol Immunol* 316:71-95. En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa se une a interferón alfa o su receptor e inhibe la interacción entre interferón alfa y su receptor.

En algunas realizaciones, el inhibidor de interferón alfa es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína de interferón alfa. (A partir de ahora en este documento, el anticuerpo a veces puede mencionarse como "anticuerpo anti-interferón alfa"). Los anticuerpos anti-interferón alfa ejemplares son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090324605, 20070059309 y 20080160030; patentes de Estados Unidos n.º 7.087.726 y 4.423.147.

Anticuerpos anti-interferón alfa ejemplares adicionales que pueden usarse en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, MEDI-545 (MDX-1103; AstraZeneca/Medimmune).

Métodos para producir un anticuerpo

Los métodos adecuados para producir un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un anticuerpo anti-interferón alfa), o fragmentos de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la descripción, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245) y se describen en este documento. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales anti-C5 usando células que expresan el componente C5 del complemento, un polipéptido C5, o un fragmento antigénico del polipéptido C5, como inmunógeno, creando por tanto una respuesta inmunitaria en animales de los que pueden aislarse células productoras de anticuerpo y su vez anticuerpos monoclonales. La secuencia de dichos anticuerpos puede determinarse y producirse los anticuerpos y variantes de los mismos por técnicas recombinantes. Pueden usarse técnicas recombinantes para producir anticuerpos quiméricos, con CDR injertada, humanizados y completamente humanos basándose en la secuencia de los anticuerpos monoclonales, así como de los polipéptidos capaces de unirse al componente C5 del complemento humano. Asimismo, pueden generarse anticuerpos monoclonales anti-interferón alfa usando un polipéptido

interferón alfa, o un fragmento antigénico del polipéptido interferón alfa, como inmunógeno, creando de ese modo una respuesta inmunitaria en los animales de los que pueden aislarse células productoras de anticuerpo y a su vez anticuerpos monoclonales.

5 Además, pueden seleccionarse anticuerpos derivados de bibliotecas recombinantes ("anticuerpos fagos") usando polipéptidos antigénicos tales como una proteína componente del complemento o interferón alfa, como cebo para aislar los anticuerpos o polipéptidos sobre la base de especificidad de diana. La producción y aislamiento de anticuerpos no humanos y quiméricos también están dentro del ámbito del experto en la materia.

10 Puede usarse tecnología de ADN recombinante para modificar una o más características de los anticuerpos producidos en células no humanas. Por tanto, pueden construirse anticuerpos quiméricos para disminuir la inmunogenicidad de los mismos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Además, la inmunogenicidad puede minimizarse humanizando los anticuerpos por injerto de CDR y, opcionalmente, modificación de la región flanqueante. Véanse, las patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539 y 7.393.648.

15 Pueden obtenerse anticuerpos de suero animal o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, pueden producirse en cultivo celular. Puede usarse tecnología de ADN recombinante para producir los anticuerpos de acuerdo con procedimientos establecidos, incluyendo procedimientos en cultivo celular bacteriano o preferiblemente de mamífero. El sistema de cultivo celular seleccionado preferiblemente secreta el producto de anticuerpo.

20 En otra realización, un proceso para la producción de un anticuerpo descrito en este documento incluye cultivar un hospedador, por ejemplo, *E. coli* o una célula de mamífero, que se ha transformado con un vector híbrido. El vector incluye uno o más casetes de expresión que contienen un promotor unido de forma funcional a una primera secuencia de ADN que codifica un péptido señal unido en la fase de lectura apropiada a una segunda secuencia de ADN que codifica la proteína de anticuerpo. La proteína de anticuerpo después se recoge y aísla. Opcionalmente, el casete de expresión puede incluir un promotor unido de forma funcional a secuencias policistrónicas (por ejemplo, bicistrónicas) de ADN que codifican proteínas de anticuerpo unidas cada una individualmente de forma funcional a un péptido señal en la fase de lectura apropiada.

25 La multiplicación de células de hibridoma o de células hospedadora de mamífero *in vitro* se realiza en medios adecuados de cultivo, que incluyen los medios de cultivo convencionales habituales (tales como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640), opcionalmente reforzado por un suero de mamífero (por ejemplo, suero fetal de ternera), o elementos traza y suplementos que sostienen el crecimiento (por ejemplo, células de alimentación tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células esplénicas, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico o similares). La multiplicación de las células hospedadoras que son células bacterianas o células de levadura se realiza asimismo en medios de cultivo adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, para bacterias, los medios de cultivo adecuados incluyen medio LE, NZCYM, NZYM, NZM, caldo Terrific, SOB, SOC, 2 xYT, o medio mínimo M9. Para levaduras, los medios de cultivo adecuados incluyen medio YPD, YEPD, medio mínimo o medio Dropout mínimo completo.

30 La producción *in vitro* proporciona preparaciones relativamente puras de anticuerpos y permite aumentar de escala la producción para dar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Las técnicas para el cultivo de células bacterianas, levaduras, células vegetales o de mamífero son conocidas en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea (por ejemplo, en un reactor suspendido o en un reactor de agitación continua), y cultivo celular inmovilizado o atrapado (por ejemplo, en fibras huecas, en microcápsulas, en microperlas de agarosa o en cartuchos de cerámica).

35 También pueden obtenerse grandes cantidades de los anticuerpos deseados multiplicando las células de mamífero *in vivo*. Para este propósito, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se inyectan en mamíferos histocompatibles para causar el crecimiento de tumores productores de anticuerpos. Opcionalmente, los animales se sensibilizan con un hidrocarburo, especialmente aceites minerales tales como pristano (tetrametilpentadecano), antes de la inyección. Después de una a tres semanas, los anticuerpos se aíslan de los fluidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, las células de hibridoma obtenidas por fusión de células adecuadas de mieloma con células esplénicas productoras de anticuerpos de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de la línea celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c opcionalmente pre-tratados con pristano. Después de una a dos semanas, se recoge el fluido ascítico de los animales.

40 Las técnicas anteriores, y otras, se analizan en, por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495-497; la patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor. Las técnicas para la preparación de moléculas recombinantes de anticuerpo se describen en las referencias anteriores y también en, por ejemplo: el documento WO97/08320; la patente de Estados Unidos n.º 5.427.908; la patente de Estados Unidos n.º 5.508.717; Smith (1985) Science 225:1315-1317; Parmley y Smith (1988) Gene 73:305-318; De La Cruz et al., (1988) Journal of Biological Chemistry 263:4318-4322; la patente de Estados Unidos

n.º 5.403.484; la patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; el documento WO88/06630; el documento WO92/15679; la patente de Estados Unidos n.º 5.780.279; la patente de Estados Unidos n.º 5.571.698; la patente de Estados Unidos n.º 6.040.136; Davis et al., (1999) Cancer Metastasis Rev 18(4):421-5; y en Taylor et al., (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Tomizuka et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(2): 722-727.

5 Los sobrenadantes de cultivo celular se exploran para los anticuerpos deseados por, por ejemplo, inmunotransferencia, por inmunoensayo enzimático, por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich o por un ensayo de aplicación puntual o un radioinmunoensayo.

10 Para el aislamiento de los anticuerpos, las inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo o en el fluido ascítico pueden concentrarse, por ejemplo, por precipitación con sulfato de amonio, diálisis frente a material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas o similares. Si fuera necesario y/o se deseara, los anticuerpos se purifican por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno-) afinidad, por ejemplo, cromatografía de afinidad con uno o más polipéptidos superficiales derivados de una línea celular que expresa el componente C5 del complemento, o con proteína-A o -G.

Otra realización proporciona un proceso para la preparación de una línea celular bacteriana que secreta anticuerpos dirigidos contra una proteína (por ejemplo, una proteína del complemento o interferón alfa) en un mamífero adecuado. Se construye una biblioteca de presentación en fagos producida a partir del conejo inmunizado y se selecciona para los anticuerpos deseados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

También se describen células de hibridoma que secretan los anticuerpos monoclonales. Las células de hibridoma preferidas son genéticamente estables, secretan anticuerpos monoclonales descritos en este documento de la especificidad deseada, y pueden expandirse a partir de cultivos en congelación profunda por descongelación y propagación *in vitro* o como fluido ascítico *in vivo*.

En otra realización, se proporciona un proceso para la preparación de una línea celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales contra una proteína de interés (por ejemplo, proteína C5 o interferón alfa). En ese proceso, se inmuniza un mamífero adecuado, por ejemplo, un ratón Balb/c, con uno o más antígenos polipeptídicos de interés o fragmentos antigénicos de los mismos. Las células productoras de anticuerpo del mamífero inmunizado se cultivan brevemente en cultivo o se fusionan con células de una línea celular adecuada de mieloma. Las células híbridas obtenidas en la fusión se clonan, y los clones celulares que secretan los anticuerpos deseados se seleccionan. Los métodos para preparar una línea celular de hibridoma incluyen inmunizar ratones Balb/c inyectando por vía subcutánea y/o por vía intraperitoneal una composición inmunogénica que contiene la proteína de interés (o un fragmento inmunogénico de la misma) varias veces, por ejemplo, de cuatro a seis veces, durante varios meses, por ejemplo, entre dos y cuatro meses. Las células esplénicas de los ratones inmunizados se recogen de dos a cuatro días después de la última inyección y se fusionan con células de la línea celular de mieloma PAI en presencia de un promotor de fusión, preferiblemente polietilenglicol. Preferiblemente, las células de mieloma se fusionan con un exceso de tres a veinte veces de las células esplénicas de los ratones inmunizados en una solución que contiene de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 % de polietilenglicol de un peso molecular de aproximadamente 4000. Después de la fusión, las células se expanden en medios adecuados de cultivo como se describe *supra*, suplementados con un medio de selección, por ejemplo, medio HAT, a intervalos regulares para prevenir que las células normales de mieloma crezcan en exceso de las células de hibridoma deseadas.

Los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden ser "quiméricos". Los anticuerpos quiméricos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden partes de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y ser humano). Los anticuerpos quiméricos pueden producirse con regiones variables de ratón de especificidad deseada cortadas y empalmadas en segmentos génicos del dominio constante humano (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). De este modo, puede modificarse anticuerpos no humanos para hacerlos más adecuados para aplicación clínica en seres humanos (por ejemplo, métodos para tratar o prevenir la enfermedad de Degos en un sujeto humano).

Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción incluyen formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, de ratón). Los mAb humanizados o de CDR injertada son particularmente útiles como agentes terapéuticos para seres humanos porque no se eliminan de la circulación tan rápidamente como los anticuerpos de ratón y típicamente no provocan una reacción inmunitaria adversa. Los métodos de preparación de anticuerpos humanizados son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, la humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327; y Verhoeven et al., (1988) Science 239:1534-1536), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Véase, también, por ejemplo, Staelens et al., (2006) Mol Immunol 43:1243-1257. En algunas realizaciones, las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de ratón) son anticuerpos humanos (anticuerpo receptor) en que los restos de la región hipervariable (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de unión deseadas. En algunos casos, los restos de la

región flanqueante de la inmunoglobulina humana también se remplazan por los correspondientes restos no humanos (llamadas "retromutaciones"). Además, pueden usarse bibliotecas de presentación en fagos para variar los aminoácidos en posiciones elegidas dentro de la secuencia de anticuerpo. Las propiedades de un anticuerpo humanizado también se ven afectadas por la elección de la región flanqueante humana. Además, los anticuerpos humanizados y quimerizados pueden modificarse para que comprendan restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante para mejorar adicionalmente las propiedades del anticuerpo tales como, por ejemplo, afinidad o función efectora.

También se proporcionan anticuerpos completamente humanos en la descripción. La expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas (es decir, anticuerpos humanizados). Los anticuerpos completamente humanos o humanos pueden obtenerse de ratones transgénicos que portan genes de anticuerpos humanos (que portan los exones variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y constante (C)) o de células humanas. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:2551; Jakobovits et al., (1993) Nature 362:255-258; Bruggemann et al., (1993) Year in Immunol 7:33; y Duchosal et al., (1992) Nature 355:258. Puede modificarse por ingeniería cepas de ratones transgénicos para que contengan secuencias génicas de genes de inmunoglobulina humana no reordenados. Las secuencias humanas pueden codificar las cadenas tanto pesada como ligera de anticuerpos humanos y funcionarían correctamente en los ratones, experimentando reordenamiento para proporcionar un amplio repertorio de anticuerpos similar al de seres humanos. Los ratones transgénicos pueden inmunizarse con la proteína diana para crear una serie diversa de anticuerpos específicos y su ARN codificante. Los ácidos nucleicos que codifican los componentes de cadena del anticuerpo de dichos anticuerpos después pueden clonarse a partir del animal en un vector de presentación. Típicamente, se clonan poblaciones diferentes de ácidos nucleicos que codifican secuencias de cadena pesada y ligera, y las poblaciones diferentes después se combinan en la inserción en el vector, de modo que cualquier copia dada del vector recibe una combinación aleatoria de una cadena pesada y de una ligera. El vector se diseña para que exprese cadenas de anticuerpo de modo que pueden ensamblarse y presentarse en la superficie exterior de un paquete de presentación que contiene el vector. Por ejemplo, las cadenas de anticuerpo pueden expresarse como proteínas de fusión con una proteína de envuelta del fago desde la superficie exterior del fago. Después de ello, los paquetes de presentación pueden explorarse para la presentación de anticuerpos que se unen a una diana.

Además, pueden obtenerse anticuerpos humanos de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., (1991) J Mol Biol 227:381; Marks et al., (1991) J Mol Biol, 222:581-597; y Vaughan et al., (1996) Nature Biotech 14:309 (1996)). Pueden crearse bibliotecas de fagos sintéticos que usan combinaciones aleatorizadas de regiones V sintéticas de anticuerpo humano. Por selección sobre el antígeno pueden prepararse anticuerpos completamente humanos en que las regiones V son de naturaleza muy de tipo humano. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.794.132, 6.680.209, 4.634.666, y Ostberg et al., (1983), Hybridoma 2:361-367.

Para la generación de anticuerpos humanos, véase también Mendez et al., (1998) Nature Genetics 15:146-156 y Green y Jakobovits (1998) J Exp Med 188:483-495. Los anticuerpos humanos se analizan adicionalmente y se delinean en las patentes de Estados Unidos n.º: 5.939.598; 6.673.986; 6.114.598; 6.075.181; 6.162.963; 6.150.584; 6.713.610; y 6.657.103 así como en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2003-0229905 A1, 2004-0010810 A1, US 2004-0093622 A1, 2006-0040363 A1, 2005-0054055 A1, 2005-0076395 A1, 2005-0287630 A1. Véanse también las publicaciones internacionales n.º WO 94/02602, WO 96/34096, y WO 98/24893, y la patente europea n.º EP 0 463 151 B1.

En un enfoque alternativo, otros han utilizado, incluyendo GenPharm International, Inc., un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig través de la inclusión de trozos (genes individuales) del locus Ig. Por tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para su inserción en un animal. Este enfoque se describe en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º: 5.545.807; 5.545.806; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; 5.770.429; 5.789.650; y 5.814.318; 5.591.669; 5.612.205; 5.721.367; 5.789.215; 5.643.763; 5.569.825; 5.877.397; 6.300.129; 5.874.299; 6.255.458; y 7.041.871. Véase también la patente europea n.º 0 546 073 B1, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884. Véase adicionalmente Taylor et al., (1992) Nucleic Acids Res 20: 6287; Chen et al., (1993) Int. Immunol. 5: 647; Tuailon et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 3720-4; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4: 117; Lonberg et al., (1994) Nature 368: 856-859; Taylor et al., (1994) International Immunology 6: 579-591; Tuailon et al., (1995) J Immunol 154: 6453-65; Fishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14: 845; y Tuailon et al., (2000) Eur J Immunol. 10:2998-3005.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos desinmunizados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos desinmunizados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos que se han modificado para volver al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno del mismo no inmunogénico, o menos inmunogénico, para una especie dada (por ejemplo, para un ser humano). La desinmunización puede conseguirse modificando el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 04/108158 y WO 00/34317). Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede desinmunizarse identificando epítomos de células T y/o epítomos de células B potenciales dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo y retirando uno o más de los epítomos de células T y/o epítomos de células B potenciales del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, usando técnicas recombinantes. El anticuerpo modificado o el fragmento de unión a antígeno del mismo después puede producirse opcionalmente y ensayarse para identificar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que han retenido una o más de las actividades biológicas deseadas, tales como, por ejemplo, afinidad de unión, pero tienen inmunogenicidad reducida. Los métodos para identificar epítomos de células T y/o epítomos de células B potenciales pueden realizarse usando técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, métodos informáticos (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 02/069232) técnicas *in vitro* o *in silico*, y ensayos biológicos o métodos físicos (tales como, por ejemplo, determinación de la unión de péptidos a moléculas MHC, determinación de la unión de complejos péptido:MHC a receptores de células T de la especie que tiene que recibir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, ensayo de la proteína o partes peptídicas de la misma usando animales transgénicos con las moléculas MHC de la especie que tiene que recibir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o ensayo con animales transgénicos reconstituidos con células del sistema inmunitario de la especie que tiene que recibir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, etc.). En diversas realizaciones, los anticuerpos desinmunizados descritos en este documento incluyen fragmentos de unión a antígeno desinmunizados, Fab, Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales, anticuerpos murinos, anticuerpos modificados por ingeniería (tales como, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, de CDR injertada, humanizados, completamente humanos y anticuerpos seleccionados de forma artificial), anticuerpos sintéticos y anticuerpos semi-sintéticos.

En algunas realizaciones, se produce un ADN recombinante que comprende un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un anticuerpo anti-interferón alfa) y se transfecta en una célula hospedadora para la expresión del anticuerpo. El término ADN incluye ADN monocatenarios codificantes, ADN bicatenarios que consisten en dichos ADN codificantes y ADN complementarios a los mismos, o estos propios ADN complementarios (monocatenarios).

Además, el ADN que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos anti-C5 puede sintetizarse de forma enzimática o química para que contenga la secuencia de ADN auténtica que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o el dominio variable de cadena ligera, o un mutante de los mismos. Un mutante del ADN auténtico es un ADN que codifica un dominio de cadena variable pesada y un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos mencionados anteriormente en que uno o más aminoácidos están delecionados, insertados o intercambiados con uno o más aminoácidos diferentes. Preferiblemente, dicha o dichas modificaciones están fuera de las CDR del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo en aplicaciones de humanización y optimización de la expresión. La expresión ADN mutante también abarca mutantes silenciosos donde uno o más nucleótidos están reemplazados por otros nucleótidos con los nuevos codones que codifican el mismo o mismos aminoácidos. La expresión secuencia mutante también incluye una secuencia degenerada. Las secuencias degeneradas están degeneradas dentro del significado del código genético porque una cantidad ilimitada de nucleótidos está reemplazada por otros nucleótidos sin provocar un cambio de la secuencia de aminoácidos originalmente codificada. Dichas secuencias degeneradas pueden ser útiles debido a sus diferentes sitios de restricción y/o frecuencia de codones particulares que son preferidos por el hospedador específico, particularmente *E. coli*, para obtener una expresión óptima del dominio variable murino de cadena pesada y/o un dominio variable murino de cadena ligera.

El término mutante pretende incluir un mutante de ADN obtenido por mutagénesis *in vitro* del ADN auténtico de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Para el ensamblaje de moléculas de inmunoglobulina tetraméricas completas y la expresión de anticuerpos quiméricos, los insertos de ADN recombinante que codifican los dominios de cadena pesada y ligera se fusionan con los ADN correspondientes que codifican los dominios constantes de cadena pesada y ligera, después se transfieren a células hospedadoras apropiadas, por ejemplo, después de su incorporación en vectores híbridos.

Otra realización se refiere a ADN recombinantes que codifican un polipéptido recombinante donde el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera están unidos mediante un grupo espaciador, que comprende opcionalmente una secuencia señal que facilita el procesamiento del anticuerpo en la célula hospedadora y/o una secuencia de ADN que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo y/o un sitio de escisión y/o un espaciador peptídico y/o un agente. El ADN que codifica un agente pretende ser un ADN que codifica el agente útil en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Por tanto, las moléculas de agente que son toxinas o enzimas, especialmente enzimas capaces de catalizar la activación de profármacos, están particularmente

indicadas. El ADN que codifica dicho agente tiene la secuencia de una enzima de origen natural o ADN que codifica toxina, o un mutante del mismo, y puede prepararse por métodos bien conocidos en la técnica.

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de unión a antígeno de la descripción pueden ser anticuerpos desnudos o fragmentos de unión a antígeno que no están conjugados a otros agentes, por ejemplo, un agente terapéutico o un marcador detectable. Como alternativa, el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno puede estar conjugado con un agente tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una molécula pequeña, una hormona, una enzima, un factor de crecimiento, una citoquina, una ribozima, un péptido mimético, un agente químico, un profármaco, una molécula de ácido nucleico incluyendo secuencias codificantes (tales como antisentido, iARN, construcciones de dirección génica, etc.) o un marcador detectable (por ejemplo, un agente de contraste de NMR o rayos-X, molécula fluorescente, etc.). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, Fv, scFv de cadena sencilla, Fab', y F(ab')₂) está unido a una molécula que aumenta la semivida del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno (véase anteriormente).

Están disponibles varios sistemas de vector posibles para la expresión de genes clonados de cadena pesada y de cadena ligera en células de mamífero. Una clase de vectores depende de la integración de las secuencias génicas deseadas en el genoma de la célula hospedadora. Las células que han integrado de forma estable el ADN, pueden seleccionarse introduciendo simultáneamente genes de resistencia a fármacos tales como gpt de *E. coli* (Mulligan y Berg (1981) Proc Natl Acad Sci USA, 78:2072) o Tn5 neo (Southern y Berg (1982) Mol Appl Genet 1:327). El gen marcador de selección puede estar unido a las secuencias génicas de ADN a expresar, o puede introducirse en la misma célula por co-transfección (Wigler et al., (1979) Cell 16:77). Una segunda clase de vectores utiliza elementos de ADN que confieren capacidades de replicación autónoma a un plásmido extracromosómico. Estos vectores pueden obtenerse de virus de animales, tales como virus del papiloma bovino (Sarver et al., (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79:7147), virus de polioma (Deans et al., (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:1292), o virus SV40 (Lusky y Botchan (1981) Nature 293:79).

Como un ADNc de inmunoglobulina está comprendido solamente de secuencias que representan el ARNm maduro que codifica una proteína de anticuerpo, se requieren elementos de expresión génica adicionales que regulan la transcripción del gen y el procesamiento del ARN para la síntesis de ARNm de inmunoglobulina. Estos elementos pueden incluir señales de corte y empalme, promotores de la transcripción, incluyendo promotores inducibles, potenciadores y señales de la terminación. Los vectores de expresión de ARNc que incorporan dichos elementos incluyen aquellos descritos por Okayama y Berg (1983) Mol Cell Biol 3:280; Cepko et al., (1984) Cell 37:1053; y Kaufman (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:689.

En las realizaciones terapéuticas de la presente descripción, se contemplan anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por una proteína del complemento humano o proteína interferón alfa, y la otra es por cualquier otro antígeno.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos están dentro del ámbito de los expertos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se ha basado en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello (1983) Nature 305:537-539). Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo al menos parte de las regiones de bisagra, C_H2, y C_H3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de métodos ilustrativos actualmente conocidos para generar anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., (1986) Methods in Enzymology 121:210; publicación PCT n.º WO 96/27011; Brennan et al., (1985) Science 229:81; Shalaby et al., JExp Med (1992) 175:217-225; Kostelny et al., (1992) J Immunol 148(5):1547-1553; Hollinger et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448; Gruber et al., (1994) J Immunol 152:5368; y Tutt et al., (1991) J Immunol 147:60. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método conveniente de entrecruzamiento. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Véase, por ejemplo, Kostelny et al., (1992) J Immunol 148(5):1547-1553. Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun pueden unirse a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo pueden reducirse en la región bisagra para formar monómeros y después re-oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de

anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos por el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (scFv). Véase, por ejemplo, Gruber et al., (1994) *J Immunol* 152:5368. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en, por ejemplo, Zapata et al., (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forma un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La descripción también abarca formas variantes de anticuerpos biespecíficos tales como las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable doble tetravalentes (DVD-Ig) descritas en Wu et al., (2007) *Nat Biotechnol* 25(11):1290-1297. Las moléculas DVD-Ig están diseñadas de modo que dos dominios diferentes variables de cadena ligera (VL) de dos anticuerpos precursores diferentes se unen en tándem directamente o a través de un enlazador corto por técnicas de ADN recombinante, seguido por el dominio constante de cadena ligera. Los métodos para generar moléculas DVD-Ig de dos anticuerpos precursores se describen adicionalmente en, por ejemplo, las publicaciones PCT n.º WO 08/024188 y WO 07/024715.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas

Las composiciones que contienen un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente C5 del complemento humano tal como un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un inhibidor de interferón alfa) pueden formularse como una composición farmacéutica, por ejemplo, para la administración a un sujeto para tratar la enfermedad de Degos. Las composiciones farmacéuticas generalmente incluirán un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a, e incluye, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Las composiciones pueden incluir una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de adición de ácido o una sal de adición de base (véase, por ejemplo, Berge et al., (1977) *J Pharm Sci* 66:1-19).

Las composiciones pueden formularse de acuerdo con métodos convencionales. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe adicionalmente en, por ejemplo, Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20ª Edición, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al., (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems," 7ª Edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); y en Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association," 3ª Edición (ISBN: 091733096X). En algunas realizaciones, una composición puede formularse, por ejemplo, como una solución tamponada a una concentración adecuada y adecuada para almacenamiento a 2-8 °C. En algunas realizaciones, una composición puede formularse para almacenamiento a una temperatura por debajo de 0 °C (por ejemplo, a -20 °C o a -80 °C).

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una diversidad de formas. Estas formas incluyen, por ejemplo, formas líquida, semisólida y sólida de dosificación, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende, en parte, del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Por ejemplo, composiciones que contienen un anticuerpo anti-C5 pretendido para suministro sistémico o local pueden estar en forma de soluciones inyectables o infundibles. Por consiguiente, las composiciones pueden formularse para administración de un modo parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). "Administración parenteral", "administrado por vía parenteral" y otras expresiones gramaticalmente equivalentes, como se usan en este documento, se refieren a modos de administración diferentes a administración enteral y tópica, habitualmente por inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural, intracerebral, intracraneal, intracarótidea e intraesternal (véase a continuación).

Las composiciones pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para almacenamiento estable a alta concentración. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un anticuerpo descrito en este documento en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido por esterilización en filtro. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) y/o un inhibidor de interferón alfa descrito en este documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos para la preparación incluyen secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del anticuerpo descrito en este documento más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de

un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un reactivo que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 En ciertas realizaciones, el inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o inhibidor de interferón alfa puede prepararse con un vehículo que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la
10 preparación de dichas formulaciones son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, J.R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems," Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

En algunas realizaciones, un inhibidor descrito en este documento puede formularse en una composición adecuada para administración intrapulmonar (por ejemplo, para administración a través de nebulizador) a un mamífero tal como a un ser humano. Los métodos para preparar dichas composiciones son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20080202513; las patentes de Estados Unidos n.º 7.112.341 y 6.019.968; y las publicaciones PCT n.º WO 00/061178 y WO 06/122257. Se describen formulaciones de inhalación de polvo seco y sistemas adecuados para la administración de las formulaciones en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20070235029, la
15 publicación PCT n.º WO 00/69887 y la patente de Estados Unidos n.º 5.997.848.

En algunas realizaciones, un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o un inhibidor de interferón alfa descrito en este documento puede modificarse, por ejemplo, con un resto que mejore su estabilización y/o su retención en la circulación, por ejemplo, en la sangre, suero u otros tejidos. El resto de estabilización puede mejorar la estabilidad, o la retención de, el anticuerpo en al
20 menos 1,5 (por ejemplo, al menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 o más) veces.

Los inhibidores de ácido nucleico del complemento humano descritos en este documento (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido o ARNip) pueden incorporarse en una construcción génica a usar como parte de un protocolo de
30 terapia génica para suministrar ácidos nucleicos que pueden usarse para expresar y producir agentes dentro de las células. Las construcciones de expresión de dichos componentes pueden administrarse en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de suministrar de forma eficaz el gen del componente a células *in vivo*. Los enfoques incluyen la inserción del gen objeto en vectores víricos incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus y virus del herpes simple-1 (HSV-1), o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores víricos pueden transfectar células directamente; puede suministrarse ADN plasmídico con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivatizados (por ejemplo, conjugados a anticuerpo), conjugados con polilisina, gramicidina S, envueltas víricas artificiales u otros de dichos vehículos intracelulares, así como inyección directa de la construcción génica o precipitación con CaPO₄ realizada *in vivo*. (Véase también, "Enfoques *ex vivo*", a continuación). Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen
35 pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Eglitis et al., (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:6460-6464; Wilson et al., (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:3014-3018; Armentano et al., (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:6141-6145; Huber et al., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8039-8043; Ferry et al., (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem et al., (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:7640-7644; Kay et al., (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:10892-10895; Hwu et al., (1993) J Immunol 150:4104-4115; las patentes de Estados Unidos n.º 4.868.116 y 4.980.286; las publicaciones PCT n.º WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345, y WO92/07573). Otro sistema de suministro génico vírico utiliza vectores derivados de adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner et al., (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al., (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155). Los vectores adenovíricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 o de otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos para los expertos en la materia. Otro sistema de vector vírico más, útil para el suministro del gen objeto, es el virus adenoasociado (AAV). Véase, por ejemplo, Flotte et al., (1992) Am J Respir Cell Mol Biol 7:349-356; Samulski et al., (1989) J Virol 63:3822-3828; y McLaughlin et al., (1989) J Virol 62:1963-1973.
40
45
50

55 En algunas realizaciones, puede co-formularse más de uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más) inhibidores (por ejemplo, uno o más inhibidores de C5 humano). Por ejemplo, pueden formularse juntos un ARNip específico de C5 y un anticuerpo anti-C5.

60 En algunas realizaciones, puede formularse un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un inhibidor del complemento humano tal como un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o un inhibidor de interferón alfa descrito en este documento con uno o más agentes activos adicionales útiles para tratar la enfermedad de Degos o mejorar un síntoma de la misma. Por ejemplo, puede formularse un anticuerpo anti-C5 con un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores incluyen, por ejemplo, corticosteroides, fenilbutazona, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, tracolimus y micofenolato de mofetilo, ciclofosfamida y un agente anti-CD20 tal como rituximab (Rituxan™; Biogen Idec, Cambridge, MA). En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento
65

humano puede formularse para administración a un sujeto junto con terapia intravenosa de inmunoglobulina (IVIG), transfusión de glóbulos rojos, plasmaféresis o con intercambio de plasma. Véase, por ejemplo, Dyrsen et al., (2008), *supra* y Zhu et al., (2007), *supra*.

5 En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento humano puede formularse para terapia conjunta (por ejemplo, simultánea o concurrente) con un agente antitrombótico y/o con un anticoagulante tal como, aunque sin limitación, clopidogrel, aspirina, dipiridamol, warfarina (Coumadina), heparina, fenindiona, fondaparinux, idraparinux, e inhibidores de trombina (por ejemplo, argatrobán, lepirudina, bivalirudina o dabigatrán). También puede formularse un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) para su uso con un agente fibrinolítico (por ejemplo, ancrod, ácido ϵ -aminocapróico, antiplasmina- α_1 , prostaciclina y defibrotida) para el tratamiento de enfermedad de Degos.

15 En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando la enfermedad de Degos está asociada con una infección, el inhibidor del complemento humano y/o el inhibidor de interferón alfa pueden formularse con uno o más agentes para su uso en el tratamiento de una infección. Por ejemplo, puede formularse un inhibidor de C5 con un antibiótico o con un agente antivírico.

20 Cuando el inhibidor del complemento humano tiene que usarse en combinación con un segundo agente activo, o cuando tienen que usarse dos o más inhibidores del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 y un anticuerpo anti-factor B), los agentes pueden formularse por separado o juntos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas respectivas pueden mezclarse, por ejemplo, justo antes de su administración, y administrarse juntas o pueden administrarse por separado, por ejemplo, al mismo tiempo o en diferentes momentos (véase a continuación).

25 Asimismo, cuando el inhibidor de interferón alfa (por ejemplo, un anticuerpo anti-interferón alfa) tiene que usarse en combinación con un segundo agente activo, o cuando tienen que usarse dos o más inhibidores de interferón alfa, los agentes pueden formularse por separado o juntos.

30 Como se ha descrito anteriormente, puede formularse una composición de modo que incluya una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición puede formularse para que incluya una cantidad sub-terapéutica del inhibidor y una cantidad sub-terapéutica de uno o más agentes activos adicionales de modo que los componentes en total sean terapéuticamente eficaces para tratar la enfermedad de Degos. En algunas realizaciones, puede formularse una composición para que incluya dos o más inhibidores del complemento humano, cada uno a dosis sub-terapéuticas, de modo que los inhibidores en total estén a una concentración que sea terapéuticamente eficaz para tratar la enfermedad de Degos. Puede formularse una composición de modo que incluya una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de interferón alfa (por ejemplo, un anticuerpo anti-interferón alfa o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o la composición puede formularse para que incluya una cantidad sub-terapéutica del inhibidor y una cantidad sub-terapéutica de uno o más agentes activos adicionales de modo que los componentes en total sean terapéuticamente eficaces para tratar la enfermedad de Degos. En algunas realizaciones, puede formularse una composición para incluir dos o más inhibidores de interferón alfa, cada uno a dosis sub-terapéuticas, de modo que los inhibidores en total estén a una concentración que sea terapéuticamente eficaz para tratar la enfermedad de Degos. En algunas realizaciones, la composición incluye un inhibidor del complemento humano y un inhibidor de interferón alfa. Los métodos para determinar una dosis terapéuticamente eficaz (por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-C5 o de un anticuerpo anti-interferón) son conocidos en la técnica y se describen en este documento.

Métodos para el tratamiento

50 Las composiciones descritas anteriormente son útiles en, *inter alia*, métodos para tratar o prevenir la enfermedad de Degos en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Las composiciones pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, usando una diversidad de métodos que dependen, en parte, de la vía de administración. La vía puede ser, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), inyección intraperitoneal (IP) o intramuscular.

55 La administración puede conseguirse por, por ejemplo, infusión local, inyección o mediante un implante. El implante puede ser de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas Silastic o fibras. El implante puede estar configurado para liberación sostenida o periódica de la composición al sujeto. (Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20080241223; las patentes de Estados Unidos n.º 5.501.856; 4.863.457 y 3.710.795; el documento EP488401; y el documento EP 430539). La composición puede suministrarse al sujeto mediante un dispositivo implantable basado en, por ejemplo, sistemas de difusión, erosionables o convectivos, por ejemplo, bombas osmóticas, implantes biodegradables, sistemas de electrodifusión, sistemas de electroósmosis, bombas de presión de vapor, bombas electrolíticas, bombas efervescentes, bombas piezoeléctricas, sistemas basados en erosión o sistemas electromecánicos.

65 Una dosis adecuada de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento del mismo) o un inhibidor de interferón alfa (por ejemplo, un anticuerpo anti-interferón alfa), cuya dosis es capaz de

tratar o prevenir la enfermedad de Degos en un sujeto, puede depender de una diversidad de factores incluyendo, por ejemplo, la edad, género y peso de un sujeto a tratar y el compuesto inhibidor particular usado. Por ejemplo, puede requerirse una dosis diferente de un ARNip específico para C5 humano para tratar a un sujeto con enfermedad de Degos en comparación con la dosis de un anticuerpo anti-C5 requerida para tratar al mismo paciente. Otros factores que afectan a la dosis administrada al sujeto incluyen, por ejemplo, el tipo o gravedad de enfermedad de Degos. Por ejemplo, un sujeto que tiene una forma cutánea de enfermedad de Degos puede requerir la administración de una dosificación diferente del inhibidor que un sujeto con una forma sistémica de enfermedad de Degos. Otros factores pueden incluir, por ejemplo, otros trastornos médicos que afectan de forma concurrente o previa al sujeto, la salud general del sujeto, la disposición genética del sujeto, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y cualquier otro agente terapéutico adicional que se administre al sujeto. También debe entenderse que una dosificación y régimen de tratamiento específicos para cualquier sujeto particular dependerá del criterio del facultativo médico que esté tratando (por ejemplo, doctor o enfermera).

El inhibidor puede administrarse como una dosis fija, o en una dosis de miligramo por kilogramo (mg/kg). En algunas realizaciones, la dosis también puede elegirse para reducir o evitar la producción de anticuerpos u otras respuestas inmunitarias del hospedador contra uno o más agentes activos de la composición. Aunque no se pretende que sean limitantes de ningún modo, las dosificaciones ejemplares de un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) y/o un inhibidor de interferón alfa incluyen, por ejemplo, 1-100 µg/kg, 0,5-50 µg/kg, 0,1-100 µg/kg, 0,5-25 µg/kg, 1-20 µg/kg, y 1-10 µg/kg, 1-100 mg/kg, 0,5-50 mg/kg, 0,1-100 mg/kg, 0,5-25 mg/kg, 1-20 mg/kg, y 1-10 mg/kg. Las dosificaciones ejemplares de un anticuerpo descrito en este documento incluyen, sin limitación, 0,1 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1,0 µg/kg, 2,0 µg/kg, 4 µg/kg, y 8 µg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4 mg/kg, y 8 mg/kg.

En algunas realizaciones, puede administrarse por vía intravenosa a un ser humano un anticuerpo anti-C5 (por ejemplo, eculizumab) a una dosis de aproximadamente 900 mg aproximadamente cada 12 (por ejemplo, aproximadamente cada 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42, o 49 o más) días. Véase, por ejemplo, Hill et al., (2005) *Blood* 106(7):2559.

En algunas realizaciones, puede administrarse por vía intravenosa a un ser humano un anticuerpo anti-C5 (por ejemplo, eculizumab) a una dosis de aproximadamente 600 (por ejemplo, aproximadamente 625, 650, 700, 725, 750, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, o 1,000 o más) mg cada semana, opcionalmente, durante dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más) semanas. Después del tratamiento inicial, al ser humano se le puede administrar el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 900 mg aproximadamente cada 14 (por ejemplo, aproximadamente cada 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42, o 49 o más) días, por ejemplo, como una dosis de mantenimiento. Véase, por ejemplo, Hillmen et al., (2004) *N Engl J Med.* 350(6):552-9 y Dmytrijuk et al., (2008) *The Oncologist* 13(9):993.

Una composición farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente C5 del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de interferón alfa. Dichas cantidades eficaces pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia basándose, en parte, en el efecto del inhibidor administrado, o en el efecto combinatorio del anticuerpo y uno o más agentes activos adicionales, si se usa más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) también puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el género y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo (y uno o más agentes activos adicionales) de provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, mejora de al menos un parámetro de la afección, por ejemplo, mejora de al menos un síntoma de la enfermedad de Degos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) puede inhibir (disminuir la gravedad de o eliminar la aparición de) y/o prevenir la enfermedad de Degos, y/o uno cualquiera de los síntomas de la enfermedad de Degos conocidos en la técnica o descritos en este documento. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición está contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz", o expresiones similares usadas en este documento, pretenden indicar una cantidad de un agente (por ejemplo, un inhibidor del complemento humano) que provocará la respuesta biológica o médica deseada (por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de la enfermedad de Degos). En algunas realizaciones, una composición descrita en este documento contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente C5 del complemento humano. En algunas realizaciones, una composición descrita en este documento contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o de un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína componente C5 del complemento. En algunas realizaciones, la composición contiene dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 u 11 o más) inhibidores diferentes del complemento humano, de modo que la composición como conjunto es terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, una composición puede contener un anticuerpo que se une a una proteína C5 humana y un ARNip que se une a, y promueve la degradación de, un ARNm que codifica una proteína C5 humana, donde el anticuerpo y el ARNip están cada uno a una concentración que cuando se combinan, son terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, la composición contiene el inhibidor y uno o más segundos

agentes activos, de modo que la composición como conjunto es terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, la composición puede contener un anticuerpo que se une a una proteína C5 humana y otro agente útil para tratar o prevenir la enfermedad de Degos.

- 5 En algunas realizaciones, una composición descrita en este documento contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-interferón alfa o de un fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas composiciones pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos conocidos en cultivos celulares o en animales experimentales. Estos procedimientos pueden usarse, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Las composiciones, o los inhibidores del complemento (por ejemplo, anticuerpos anti-C5) de las composiciones, que muestran altos índices terapéuticos son preferidas. Aunque pueden usarse composiciones que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado y de minimizar el daño potencial a las células normales y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

15 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos inhibidores recae generalmente dentro de un intervalo de concentración en circulación del inhibidor o inhibidores (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5, un anticuerpo anti-interferón alfa, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para un inhibidor del componente C5 del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) usado como se describe en este documento (por ejemplo, para tratar o prevenir la enfermedad de Degos), la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Los niveles del inhibidor del complemento en, por ejemplo, el plasma de seres humanos o animales tratados pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

20 En algunas realizaciones, la dosis requerida de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) puede determinarse basándose en la concentración en la sangre del sujeto de la proteína del complemento a la que está dirigido el inhibidor. Por ejemplo, un sujeto que tiene una concentración mayor de niveles en circulación de proteína C5 humana puede requerir una dosis mayor de un inhibidor de C5 humano que un sujeto que tiene niveles inferiores de C5 humana en circulación. Los métodos para determinar la concentración del complemento humano en una muestra de fluido obtenida de la sangre de un sujeto son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describe un método para determinar los niveles en suero de C5 en, por ejemplo, Rawal et al., (1998) J Biol Chem 273(27):16828-16835.

25 Un "sujeto", como se usa en este documento, puede ser cualquier mamífero. Por ejemplo, un sujeto puede ser un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, mono, babuino o chimpancé), un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un conejo, una cobaya, un gerbo, un hámster, una rata o un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un lactante (por ejemplo, un lactante humano).

30 En algunas realizaciones, el sujeto es uno que es refractario a uno o más agentes terapéuticos adicionales que se administraron para tratar la enfermedad de Degos. "Resistencia" a una terapia, "refractario" a terapia, y expresiones gramaticales similares, como se usan en este documento, se refieren a un estado clínico del paciente, en el que hay una reducción en la eficacia de una terapia dada en el tratamiento o cura de un trastorno dado (por ejemplo, enfermedad de Degos) o una reducción en la eficacia del tratamiento y la mejora de uno o más síntomas asociados con el trastorno. Por ejemplo, los beneficios terapéuticos de IVI_g a un paciente aquejado de enfermedad de Degos pueden disminuir en el tiempo de modo que la enfermedad permanezca o progrese incluso con la terapia IVI_g. Véase, por ejemplo, De Breucker et al., (2008), *supra*.

35 Como se usa en este documento, un sujeto "en necesidad de prevención", "en necesidad de tratamiento" o "que lo necesita", se refiere a uno, que a criterio de un facultativo médico apropiado (por ejemplo, un doctor, una enfermera o un facultativo de enfermería en el caso de seres humanos; un veterinario en el caso de mamíferos no humanos), se beneficiaría de forma razonable de un tratamiento dado (tal como tratamiento con una composición que comprende un inhibidor del complemento humano o un inhibidor de interferón alfa).

40 Como se usa en este documento, un sujeto "en riesgo de desarrollar enfermedad de Degos" es un sujeto que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más) factores de riesgo de desarrollar el trastorno. Los factores de riesgo para la enfermedad de Degos son bien conocidos en la técnica de medicina e incluyen, por ejemplo, una predisposición a desarrollar la afección, es decir, una historia familiar de la afección o un estado genético asociado con enfermedad de Degos tal como, por ejemplo, una deficiencia de proteína S. Véase, por ejemplo, Gileberte et al., (2005) Br J Dermatol 153(3):666-7. Los factores de riesgo para enfermedad de Degos también incluyen aquellas afecciones que están asociadas con enfermedad de Degos tales como, aunque sin limitación, infecciones víricas (por ejemplo, infecciones por VIH o por parvovirus B19), un estado pro-coagulante (por ejemplo, Factor V Leiden), o una enfermedad autoinmunitaria tal como LE, dermatomiositis, esclerodermia y

síndrome antifosfolípido. A partir de ahora en este documento, dichas manifestaciones de enfermedad de Degos pueden mencionarse, cuando sea apropiado, como, por ejemplo, "enfermedad de Degos asociada a infección" o "enfermedad de Degos asociada a enfermedad autoinmunitaria". A partir de lo anterior, quedará claro que los sujetos "en riesgo de desarrollar enfermedad de Degos" no son todos los sujetos dentro de una especie de interés.

Un sujeto "sospechoso de tener enfermedad de Degos" es uno que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más) síntomas de la afección. Los síntomas de esta afección son conocidos para los expertos en la materia de medicina e incluyen, por ejemplo, lesiones cutáneas (por ejemplo, una o más pápulas que están elevadas y de color carne o rosadas, que son pápulas que progresan hasta cicatrices profundas con centros blancos y eritema adyacente y telangiectasia), hemorragia gastrointestinal, vómitos, fístula enterocutánea, síntomas neurológicos (por ejemplo, parestesia facial o acral, cefaleas, vértigos, afagia, paraplejía, parálisis visual, epilepsia, pérdida de memoria o sensibilidad alterada), apoplejía, diplopía, ptosis, defectos del campo visual, debilidad, falta de aliento y dolor pectoral. En algunas realizaciones, la enfermedad de Degos está asociada con la presencia en los pacientes de anticuerpos anti-cardiolipina, el anticoagulante lúpico, anticuerpos anti-fosfolípido o deposición de IgA vascular. Véase, por ejemplo, Englert et al., (1984), *supra*; Crowson et al., (2002), *supra*; y Grattan y Burton (1991) *Semin Dermatol* 10(3):152-159. A partir de lo anterior, quedará claro que los sujetos "sospechosos de tener la enfermedad de Degos" no son todos los sujetos dentro de una especie de interés.

En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir identificar al sujeto como uno que tiene, es sospechoso de tener o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Degos. Los métodos adecuados para identificar al sujeto son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Ackerman describe un método histológico para identificar de forma positiva una lesión cutánea asociada a enfermedad de Degos. *Am J Dermatopathol* (1985) 7(2):105-7. Como se ha descrito anteriormente, la enfermedad de Degos puede estar asociada con la presencia en los pacientes de anticuerpos anti-cardiolipina, el anticoagulante lúpico y/o anticuerpos anti-fosfolípido. Los métodos histológicos de diagnóstico también se ejemplifican en los ejemplos de trabajo. Los métodos adecuados para detectar la presencia de estos anticuerpos en la sangre de un paciente son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Caux et al., (1994) *Ann Dermatol Venereol* 121:537-542. En algunas realizaciones, la enfermedad de Degos puede estar asociada con deposición de IgA dentro de la vasculatura cutánea. Los métodos para detectar dicha deposición son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Crowson et al., (2002), *supra*.

Además, como se describe en los ejemplos de trabajo, la enfermedad de Degos puede estar asociada con deposición vascular prominente de MAC C5b-9, así como a niveles elevados en suero de proteína C reactiva y factor VIII. Los métodos para detectar cada uno de estos parámetros se ejemplifican en este documento.

En algunas realizaciones, la composición puede administrarse a un sujeto de forma profiláctica para prevenir la progresión de una forma benigna de enfermedad de Degos a la forma multiorgánica sistema de la enfermedad. Por ejemplo, a un sujeto que tiene una forma cutánea de enfermedad de Degos se le puede administrar una composición descrita en este documento para prevenir o disminuir la probabilidad de desarrollo en el paciente de la forma sistémica mortal de enfermedad de Degos. Asimismo, a un sujeto que tiene una infección por parvovirus B19 asociada a enfermedad de Degos, una infección por VIH o una enfermedad autoinmunitaria, se le puede administrar una composición descrita en este documento para prevenir o disminuir la probabilidad del desarrollo de enfermedad de Degos en el paciente.

El término "prevenir" está reconocido en la técnica, y cuando se usa en relación a una afección, está bien entendido en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retarda la aparición de, síntomas de una afección médica en un sujeto respecto a un sujeto que no recibe la composición. Por tanto, la prevención de la enfermedad de Degos incluye, por ejemplo, ralentizar la progresión de la forma benigna de enfermedad de Degos a la forma multiorgánica sistémica de la enfermedad en una población de pacientes que recibe un tratamiento profiláctico respecto a una población de control no tratada, y/o reducir la gravedad y/o retardar la aparición del uno o más síntomas de la enfermedad en una población tratada frente a una población de control no tratada, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y/o el inhibidor de interferón alfa pueden administrarse a un sujeto como una monoterapia. Como alternativa, como se describe anteriormente, el inhibidor puede administrarse a un sujeto como una terapia de combinación con otro tratamiento, por ejemplo, otro tratamiento para la enfermedad de Degos. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir administrar al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) uno o más agentes adicionales (por ejemplo, anticoagulantes o agentes antiinflamatorios) que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, enfermedad de Degos. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) o un inhibidor del interferón alfa y el uno o más agentes activos adicionales se administran al mismo tiempo. En otras realizaciones, el inhibidor se administra primero en el tiempo y el uno o más agentes activos adicionales se administran en segundo lugar en el tiempo. En algunas realizaciones, el uno o más agentes activos adicionales se administran primero en el tiempo y el inhibidor se administra en segundo lugar en el tiempo.

5 El inhibidor del complemento humano o el inhibidor de interferón alfa puede reemplazar o aumentar una terapia administrada de forma previa o concurrente. Por ejemplo, tras el tratamiento con un anticuerpo anti-C5 o con un fragmento de unión a antígeno del mismo, la administración del uno o más agentes activos adicionales puede cesar o disminuir, por ejemplo, puede administrarse a niveles inferiores. En algunas realizaciones, la administración de la terapia previa puede mantenerse. En algunas realizaciones, se mantendrá una terapia previa hasta que el nivel de inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5) o de inhibidor de interferón alfa alcance un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Las dos terapias pueden administrarse en combinación.

10 El control de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para una mejora en la enfermedad de Degos, como se define en este documento, significa evaluar al sujeto para un cambio en un parámetro de la enfermedad, por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, un facultativo médico puede examinar el grado de deposición vascular de MAC C5b-9 antes y después del tratamiento usando un inhibidor del complemento descrito en este documento. Dichos síntomas incluyen cualquiera de los síntomas de enfermedad de Degos descritos en este documento. En algunas realizaciones, la evaluación se realiza al menos 1 hora, por ejemplo, al menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 o 48 horas, o al menos 1 día, 2 días, 4 días, 10 días, 13 días, 20 días o más, o al menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas o más, después de una administración. El sujeto puede evaluarse en uno o más de los siguientes periodos: antes de empezar el tratamiento; durante el tratamiento; o después de haber administrado uno o más elementos del tratamiento. La evaluación puede incluir evaluar la necesidad de tratamiento adicional, por ejemplo, evaluar si una dosificación, frecuencia de administración o duración del tratamiento debe alterarse. También puede incluir evaluar la necesidad de añadir o de disminuir una modalidad terapéutica seleccionada, por ejemplo, añadir o disminuir cualquiera de los tratamientos para la enfermedad de Degos descritos en este documento.

25 Enfoques *ex vivo*. Cuando el inhibidor del complemento humano o el inhibidor de interferón alfa es un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) o un ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip o ácido nucleico antisentido), una estrategia *ex vivo* para tratar o prevenir la enfermedad de Degos puede implicar transfectar o transducir una o más células obtenidas de un sujeto con un polinucleótido que codifica la proteína o el ácido nucleico. Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un único vector que codifica una cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-C5 o las células pueden transfectarse con un primer vector que codifica una cadena pesada y con un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo.

35 Las células transfectadas o transducidas después se devuelven al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de una amplia gama de tipos incluyendo, sin limitación, células hemopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares. Dichas células pueden actuar como fuente (por ejemplo, fuente sostenida o periódica) del inhibidor del complemento (por ejemplo, el anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o ARNip anti-C5) o del inhibidor de interferón alfa durante todo el tiempo que sobrevivan en el sujeto. En algunas realizaciones, los vectores y/o las células pueden configurarse para la expresión inducible o reprimible del anticuerpo (véase, por ejemplo, Schockett et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 5173-5176 y la patente de Estados Unidos n.º 7.056.897).

40 Preferiblemente, las células se obtienen del sujeto (autólogas), pero potencialmente pueden obtenerse de un sujeto de la misma especie diferente del sujeto (alogénicas).

45 Los métodos adecuados para obtener células de un sujeto y transducir o transfectar las células son conocidos en la técnica de biología molecular. Por ejemplo, la etapa de transducción puede conseguirse por cualquier medio convencional usado para terapia génica *ex vivo*, incluyendo fosfato cálcico, lipofección, electroporación, infección vírica (véase anteriormente) y transferencia génica biolística. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., (*supra*) y Ausubel et al., (1992) "Current Protocols in Molecular Biology," Greene Publishing Associates. Como alternativa, pueden usarse liposomas o micropartículas poliméricas. Las células que se han transducido de forma satisfactoria pueden seleccionarse, por ejemplo, para la expresión de la secuencia codificante o de un gen de resistencia a fármacos.

Kits

55 La descripción también caracteriza artículos de fabricación o kits, que incluyen un recipiente con una etiqueta; y una composición que contiene uno más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más) inhibidores del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y/o uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más) inhibidores de interferón alfa (por ejemplo, un anticuerpo anti-interferón alfa). La etiqueta indica que la composición es para administrarse a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene, es sospechoso de tener, o está en riesgo de desarrollar, enfermedad de Degos. El kit puede incluir, opcionalmente, un medio para administrar la composición al sujeto. Por ejemplo, los kits pueden incluir una o más jeringas.

65 En algunas realizaciones, los kits pueden contener dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más) tipos diferentes de inhibidores del complemento humano. Por ejemplo, un kit puede contener un anticuerpo anti-C5 (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y un ARNip que se une a un ARNm que codifica

una proteína C5 humana. En algunas realizaciones, el kit puede contener un anticuerpo anti-C5, un ARNip y un inhibidor de molécula pequeña del complemento.

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir adicionalmente uno o más agente activos adicionales tales como cualquiera de los descritos en este documento. Por ejemplo, los kits pueden incluir uno o más anticoagulantes, agentes antitrombóticos o agentes antiinflamatorios. Los kits también pueden incluir una o más terapias dirigidas a células B tales como un anticuerpo anti-CD20. Los kits pueden incluir opcionalmente uno o más medios para detectar la presencia de anticuerpos anticardiolipina, el anticoagulante lúpico, anticuerpos antifosfolípido y/o deposición vascular de IgA.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, no limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Microscopía óptica rutinaria. Se tiñeron secciones de cinco micrómetros de grosor de tejido fijado en formalina, incrustado en parafina con hematoxilina y eosina y se examinaron por microscopía óptica convencional.

Evaluación inmunohistoquímica para MxA. Los portaobjetos para su uso en la detección de proteína MxA se colocaron en soportes de portaobjetos tisulares Tek y placas de tinción (Miles, Elkhart, IL) y se sumergieron en 200 ml de tampón EDTA, pH 8,0 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Después de una incubación de 30 minutos con los anticuerpos primarios, se realizó la tinción usando el kit disponible en el mercado Vision BioSystems Define que se adhiere al protocolo. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó usando las siguientes diluciones: anticuerpo anti-MxA 1:1600. Se hizo una evaluación semi-cualitativa respecto al grado de tinción basándose en el porcentaje aproximado de células teñidas para un marcador particular, así como la distribución de la tinción a través del portaobjetos. Los portaobjetos se cubrieron usando el sistema Shandon Consul®-Mount Histology (Producto n.º 9990440) en un aparato de cubreobjetos automatizado Consul (ThermoShandon, Pittsburgh, PA). Véase Magro et al., (2009) J Cutan Pathol (4 de noviembre, publicación electrónica antes de la edición impresa; PMID: 19891658).

Estudios de inmunofluorescencia sobre tejido. Se realizaron los siguientes estudios de inmunofluorescencia (como se describe en Crowson y Magro (1996) Human Pathol 27:15-19) sobre material de biopsia de piel obtenido en medio de transporte de Michael y posteriormente almacenado a -30 °C. Se realizaron estudios de inmunofluorescencia directa (DIF) para inmunoglobulina G (IgG), IgA, IgM, fibrina y el componente C3 del complemento (DAKO, Carpintería, CA, EE. UU.) sobre piel de lesión por sobreposición de los anticuerpos primarios conjugados a fluoresceína sobre las secciones individuales de biopsia. Se usó una metodología de inmunofluorescencia indirecta (IF) con un anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con fluoresceína para detectar la presencia de MAC C5b-9 (DAKO), mediante su unión a un anticuerpo primario anti-C5b-9 inicialmente en contacto con una sección de biopsia.

Microscopía electrónica. El tejido de biopsia de piel se colocó en fijador glutaraldehído para examen de la ultraestructura.

Cultivo celular para inmunofluorescencia indirecta y estudios de transferencia de Western. Se cultivaron células endoteliales microvasculares de sangre dérmica humana de neonato, HMVEC-dBINEo (Lonza, Walkersville, MD), a 37 °C en medio completo (medio basal EGM®-2 suplementado con reactivos EGM®-2 MV BulletKit® y FBS Premium al 5 %) (Lonza) con CO₂ al 5 %. Las células se cultivaron durante un tiempo suficiente para alcanzar del 75 al 80 % de confluencia en los matraces de cultivo. Las células después se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) caliente y se recogieron usando una solución 1 X de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de un lavado adicional con PBS, las células se volvieron a sembrar en medio completo precalentado en portaobjetos de cámara de cultivo tisular (sistema de portaobjeto de cámara Nunc Lab-Tek™, 2 pocillos en Permanox™, Sigma-Aldrich) a una densidad de 2 x 10⁴ células/ml. Los portaobjetos de cámara se cultivaron durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %, tiempo después del cual se descartó el medio. Después de la retirada del medio, los portaobjetos de cada cámara se retiraron, se aclararon en PBS, y después se secaron al aire en combinación con toallas de papel para absorber el exceso de PBS. Los portaobjetos secados después se almacenaron a -80 °C en un recipiente estanco al aire hasta que se examinaron usando microscopía de inmunofluorescencia.

Estudios de transferencia de Western. Las células HMVEC-dBINEo cultivadas se lisaron usando un tampón de lisis que consistía en fluoruro sódico 0,05 M, Tritón X-100 al 1 %, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y una dilución 1:200 de cóctel inhibidor de proteasa de Calbiochem Set III (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) durante 30 minutos a 4 °C con agitación ocasional con vórtice. Después se aclararon los núcleos y otro material insoluble de los lisados por microcentrifugación. A continuación, se añadió tampón de carga de gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) que contenía β-mercaptoetanol (concentración final del 5 %) al lisado celular (dilución 1:4 del tampón de carga 5 X en el lisado) antes de hervir durante dos minutos. Los lisados después se resolvieron por electroforesis a través de un gradiente del 8 % al 16 %

de Tris-HCl en geles de SDS-PAGE (BioRad, Hercules, CA) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Whatman Protran™ (Sigma-Aldrich). Las membranas se incubaron durante seis horas a temperatura ambiente con una solución de bloqueo de leche desnatada al 3 % y solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,1 % (TBS-T) en un agitador orbital, y después se acomodaron en un colector de transferencia Miniblotter 25 (Immunelect, Cambridge, MA). Los pocillos del Miniblotter se llenaron con suero de control del paciente o sano diluido 1:250 en TBS-T que contenía albúmina sérica bovina al 0,2 %, y el Miniblotter se balanceó suavemente durante una noche a 4 °C en un agitador orbital. Los sueros después se retiraron, se lavaron los pocillos dos veces con TBS-T, y las membranas se retiraron del aparato. Después del lavado extensivo adicional con TBS-T, las membranas se tñieron durante dos horas a temperatura ambiente con una dilución 1:20.000 de anticuerpo secundario de cabra anti-Ig (cadena pesada y ligera) humana conjugado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Después del lavado extensivo de las membranas con TBS-T, se detectaron los complejos de anticuerpo usando el sustrato de quimioluminiscencia Supersignal® West Pico (Thermo Scientific, Rockford, IL), con las bandas quimioluminiscentes visualizadas en película radiográfica HyBlot CL™ (Denville Scientific, Inc., Metuchen, NJ).

Estudios de inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de anticuerpos anti-células endoteliales. Se diluyeron muestras de suero a un factor de dilución de 1:100 y se incubaron con células endoteliales cutáneas humanas. La unión del anticuerpo se detectó usando un anticuerpo de cabra anti-Ig humana conjugado con fluoresceína (diluido 1:100 en PBS; Caltag, Burlingame, CA). Los complejos fluorescentes de anticuerpo se visualizaron usando un microscopio Olympus y las imágenes se grabaron con una cámara digital.

Ejemplo 2. Resultados

Historia clínica. Sobre un periodo de dos años, un hombre de 43 años de edad previamente sano desarrolló lesiones pequeñas asintomáticas inicialmente definidas por lesiones papulares elevadas que evolucionan en cicatrices blancas profundas. El 23 de julio de 2009, el paciente entró en la sala de urgencias con una historia de tres días de fiebres intermitentes de grado bajo acompañadas por dolor abdominal severo y vómitos teñidos de verde. Se realizó una laparotomía exploratoria - se retiró un pequeño segmento de intestino. Las muestras tanto de intestino mostraban cambios clásicos asociados con enfermedad de Degos. No se detectaron anticuerpos anticardiolipina, anticuerpos anti-beta 2 glucoproteína, o anticoagulante lúpico. Las pruebas adicionales de laboratorio confirmaron niveles anormalmente elevados de factor sérico VIII (199 por encima del normal), niveles elevados de factor de von Willebrand (VWF) (217 por encima del normal), y niveles aumentados de factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF). Aunque las proteínas C2, C3 y C4 componentes del complemento se determinaron dentro de los niveles normales, los niveles de C5 estaban elevados.

Se realizó una toracocentesis en el paciente para aliviar el neumotórax. El paciente empezó tratamiento con globulina gamma intravenosa y Lovenox® a 490 mg al día. Durante una visita de seguimiento el 12 de agosto de 2009, el paciente había perdido 6,80 kg (15 libras) debido a apetito disminuido que se puede atribuir al dolor abdominal persistente. Un examen respiratorio del paciente demostró sonidos respiratorios disminuidos en las regiones bibasilares. Los niveles de proteína C reactiva, VWF y VEGF del paciente permanecieron elevados a 6,51, 177, y 971, respectivamente. Después de cuatro tratamientos de IVIG hubo alguna mejora en las lesiones cutáneas del paciente, aunque el paciente continuó padeciendo dolor abdominal. En octubre de 2009, el paciente desarrolló dolor torácico y falta de aliento, que necesitó admisión hospitalaria. El paciente rápidamente se descompensó hemodinámicamente y se situó en la unidad médica de cuidados intensivos. Se apreció que el paciente tenía una fracción de expulsión del 14 % asociada con una gran efusión pericárdica y pleural. Se obtuvo una biopsia del pericardio que confirmó microangiopatía trombotica severa coherente con enfermedad de Degos. También se observó la deposición de C5b-9 vascular. Entonces se administró eculizumab al paciente. Sucedió una mejora casi inmediata del estado del paciente. Por ejemplo, la fracción de expulsión del paciente mejoró drásticamente. En 24 horas de recibir eculizumab, el paciente se ex-tubó y se transfirió al pabellón médico. Durante las siguientes varias semanas, el paciente mejoró sintomáticamente y hubo una mejora objetiva en el aspecto de sus lesiones cutáneas.

Patología. Se obtuvieron tres conjuntos de biopsias de piel del paciente. El momento en que estas biopsias se realizaron se asoció temporalmente con variaciones en la intervención del tratamiento. El primer conjunto se obtuvo del paciente antes de la administración de IVIG o eculizumab al paciente e indujo dos fases evolutivas de sus lesiones cutáneas. Una biopsia fue de una lesión papular elevada que reveló deposición de mucina mesenquimática notable, un hallazgo morfológico que condujo a un diagnóstico erróneo inicial de lupus eritematoso tímido dos años antes. El examen de la vasculatura reveló anomalías incluyendo hinchamiento de células endoteliales, necrosis y desprendimiento con deposición mural y luminal focal de fibrina. Una biopsia de la pápula cicatrizada profunda porcelanada asociada a enfermedad de Degos clásica demostró adelgazamiento epidérmico prominente y fibrosis dérmica con reducción vascular. Los vasos demostraron una microangiopatía trombotica oclusiva extensiva con degeneración/necrosis de células endoteliales y desprendimiento de células endoteliales en el lumen vascular. Todas las biopsias revelaron muerte de células inflamatorias. La muestra de intestino mostró una vasculopatía obliterante extensiva que afectaba a arterias de calibre más grande de la submucosa.

Varias semanas después de comenzar IVIG, se obtuvo otra biopsia de piel, cuyo análisis reveló cambios isquémicos cutáneos persistentes incluyendo mucina, fibrosis y adelgazamiento epitelial. Sin embargo, hubo una reducción en el

grado de lesión vascular activa. no se observaron vasos que contenían deposición significativa de fibrina luminal y mural.

5 Se obtuvo un conjunto adicional de biopsias (el tercer conjunto) del paciente dos semanas después de la administración de eculizumab. El análisis de tejido biopsiado reveló fibroplasias superficiales con reducción vascular. Los vasos estaban engrosados lo que refleja reduplicación de la zona de membrana basal. Solamente vasos escasos mostraban daños de células endoteliales y trombosis.

10 Evaluación de interferón alfa en muestras tisulares. Había expresión extensiva de proteína MxA en células endoteliales, en células inflamatorias y en queratinocitos epidérmicos.

15 Estudios de inmunofluorescencia de C5b-9. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta revelaron depósitos extensivos de C5b-9 dentro de la vasculatura cutánea del primer conjunto de biopsias antes de comenzar IVIG y/o eculizumab. El patrón de deposición era tanto intraluminal como mural. El grado de deposición era muy prominente, implicando a varios vasos en toda la dermis. Aunque IVIG redujo la deposición de C5b-9 en algún grado, el grado de deposición de C5b-9 observado en las biopsias obtenidas del paciente después de terapia con eculizumab estaban marcadamente disminuido. Solamente tres vasos mostraron deposición mural de C5b-9.

20 Microscopía electrónica. El análisis de la ultraestructura del tejido biopsiado obtenido previamente al tratamiento mostró estructuras reticulares tubulares extensivas en los queratinocitos epidérmicos y en las células endoteliales en toda la dermis. Las células endoteliales de revestimiento mostraron cambios degenerativos profundos con desprendimiento de las células de los lúmenes de los vasos. Las zonas de membrana basal vascular se reduplicaron y también mostraron deposición de colágeno.

25 Ensayo de anticuerpos anti-células endoteliales. El suero del paciente obtenido antes del tratamiento con eculizumab y el suero obtenido dos semanas después del tratamiento con eculizumab se incubaron con células endoteliales cutáneas y anticuerpos humanos anti-IgG conjugados con fluoresceína. Se observó decoración nuclear granular en la mayoría de las células endoteliales en las muestras previas y posteriores al tratamiento con eculizumab. No se observó tinción cuando el suero del paciente se ponía en contacto con células endoteliales de vena umbilical humana.

35 Estudios de transferencia de Western usando lisados de células endoteliales. El suero del paciente previo y posterior al tratamiento también se usó en un análisis de transferencia de Western para identificar la proteína o las proteínas a las que se unen los anticuerpos humanos anti-humano en el suero del paciente. Como se ha descrito anteriormente, el suero previo y posterior al tratamiento se incubó con una membrana que contenía las proteínas de células endoteliales resueltas por tamaño y se detectó cualquier unión de los anticuerpos a las proteínas de la membrana mediante un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína. Se observó una banda distinta de inmunoreactividad correspondiente a un peso molecular de 92 kDa. No se identificó una banda similar de reactividad en casos de control normales o en transferencias de Western de lisados de células endoteliales de vena umbilical humana.

40 Evaluación de niveles en suero de interferón alfa. Los niveles de interferón alfa en la sangre periférica del paciente eran muy altos - midiendo 20,56, que era comparable a pacientes que tienen lupus eritematoso y varias veces mayor que los niveles de interferón alfa en sangre de pacientes sanos.

45 Discusión. El paciente descrito en este documento desarrolló isquemia multifocal intestinal, pericárdica, miocárdica y cutánea, atribuible a lesión prominente de células endoteliales. Los síntomas del paciente eran coherentes con enfermedad de Degos. Usando células endoteliales cutáneas como sustrato, hubo evidencias de anticuerpos anti-células endoteliales usando inmunofluorescencia indirecta y técnicas de transferencia de Western. Se aisló un epítipo antigénico dominante basado en el análisis de transferencia de Western, aunque su identidad no está clara. 50 En vista del hallazgo de que los anticuerpos anti-células endoteliales no eran reactivos con células de vena umbilical humana, es probable que los anticuerpos anti-células endoteliales observados en este paciente fueran selectivos de órgano, mediante lo cual la inmunogenicidad contra el epítipo basado en células endoteliales seleccionado sea dependiente de sitio.

55 Los estudios descritos en este documento implican lesión endotelial mediada por el complemento como mecanismo efector probable en el paciente con enfermedad de Degos tratado con eculizumab. Hubo una respuesta drástica objetiva clínica y patológica a la administración del fármaco.

60 La expresión de interferón alfa estaba marcadamente aumentada en el suero del paciente, así como en su tejido. Se sabe que el interferón alfa regula positivamente la inmunidad adaptativa e innata, potenciando los efectos de cualquier desencadenante antigénico. La administración de interferón alfa exógeno se ha presentado como una causa de trombosis cutánea y ulceración. La firma de interferón alfa del paciente en la sangre periférica fue marcadamente similar a la observada en pacientes con SLE, aunque no hubo características clínicas específicas de lupus sistémico eritematoso. Los hallazgos descritos en este documento apoyan una conclusión de que la inhibición 65 de interferón alfa en pacientes con enfermedad de Degos puede ser útil para tratar la enfermedad.

En conclusión, eculizumab define una modalidad terapéutica importante para tratar la enfermedad de Degos que de lo contrario es mortal. El desencadenante exacto para la activación de la secuencia de la cascada del complemento no está claro. Aunque los anticuerpos anti-células endoteliales (por ejemplo, autoanticuerpos que se unen a un antígeno de 92 kDa presente en células endoteliales) que provocan la activación de la secuencia de la cascada clásica del complemento pueden ser causantes de la deposición de C5b-9, el papel del epítipo que se propaga en el curso natural de la lesión tisular imposibilita establecer un efecto causal directo de estos anticuerpos. No obstante, en algún punto en el curso clínico del paciente, serían útiles terapias adicionales dirigidas a células B para reducir la producción de estos anticuerpos para el tratamiento de enfermedad de Degos, a condición de que persistan los autoanticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Métodos y composiciones para tratar la enfermedad de Degos

<130> ALXN-153-WO1

<140>

<141>

<150> 61/309.393

<151> 01-03-2010

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1676

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 615 732 T3

Val Tyr Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val
145 150 155 160

Leu Thr Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu
165 170 175

Ile Asp His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser
180 185 190

Asn Pro Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp
195 200 205

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

Pro His Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr
225 230 235 240

Lys Asn Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr
245 250 255

Asn Lys Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg
260 265 270

Glu Asp Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln
275 280 285

Asn Thr Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu
290 295 300

Thr Ala Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn
305 310 315 320

Lys Tyr Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe
325 330 335

Ser Glu Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr
340 345 350

Lys Leu Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro
355 360 365

Tyr Pro Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly
370 375 380

Gly Val Pro Val Ile Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu
385 390 395 400

ES 2 615 732 T3

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
 405 410 415
 Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
 420 425 430
 Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
 435 440 445
 Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
 450 455 460
 Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
 465 470 475 480
 His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
 485 490 495
 Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
 500 505 510
 Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
 515 520 525
 Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
 530 535 540
 Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
 545 550 555 560
 Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
 565 570 575
 Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
 580 585 590
 Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
 595 600 605
 Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
 610 615 620
 Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640

ES 2 615 732 T3

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
 645 650 655
 Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
 660 665 670
 Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
 675 680 685
 Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
 690 695 700
 Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
 705 710 715 720
 Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
 725 730 735
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
 740 745 750
 His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
 755 760 765
 Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
 770 775 780
 Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
 785 790 795 800
 Gly Ile Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
 805 810 815
 Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
 820 825 830
 Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
 835 840 845
 Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
 850 855 860
 Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
 865 870 875 880
 Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
 885 890 895

ES 2 615 732 T3

Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
 900 905 910
 Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
 915 920 925
 Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
 930 935 940
 Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
 945 950 955 960
 Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
 965 970 975
 Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
 980 985 990
 Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
 995 1000 1005
 Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
 1010 1015 1020
 Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro
 1025 1030 1035
 Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met
 1040 1045 1050
 Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val
 1055 1060 1065
 Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu
 1070 1075 1080
 Arg Val Leu Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn
 1085 1090 1095
 Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu
 1100 1105 1110
 Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys
 1115 1120 1125

ES 2 615 732 T3

Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr
 1130 1135 1140

 Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile
 1145 1150 1155

 Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Asp Asn
 1160 1165 1170

 Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe Thr Leu
 1175 1180 1185

 Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His Pro
 1190 1195 1200

 Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
 1205 1210 1215

 Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln
 1220 1225 1230

 His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val
 1235 1240 1245

 Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp
 1250 1255 1260

 Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln
 1265 1270 1275

 Arg Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala
 1280 1285 1290

 Ile Glu Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg
 1295 1300 1305

 Leu Ser Met Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu
 1310 1315 1320

 His Asn Tyr Lys Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val
 1325 1330 1335

 Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly
 1340 1345 1350

 Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr
 1355 1360 1365

ES 2 615 732 T3

Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr
1370 1375 1380

Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp
1385 1390 1395

Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu
1400 1405 1410

Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu
1415 1420 1425

Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val
1430 1435 1440

Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly
1445 1450 1455

His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu
1460 1465 1470

Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu
1475 1480 1485

Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys
1490 1495 1500

Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys
1505 1510 1515

Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly
1520 1525 1530

Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg
1535 1540 1545

Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val
1550 1555 1560

Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys
1565 1570 1575

Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu
1580 1585 1590

ES 2 615 732 T3

Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn
 1595 1600 1605

Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu
 1610 1615 1620

Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro
 1625 1630 1635

Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg Asp Thr Thr
 1640 1645 1650

Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu Phe Ala
 1655 1660 1665

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
 1670 1675

<210> 2
 <211> 1658
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 615 732 T3

Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg Val Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu Ala Phe
 20 25 30

Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe Ser Tyr
 35 40 45

Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln Asn Ser
 50 55 60

Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln Asn Pro
 65 70 75 80

Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser Lys Ser
 85 90 95

Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile His Thr
 100 105 110

Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg Val Tyr
 115 120 125

ES 2 615 732 T3

Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val Leu Thr
130 135 140

Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu Ile Asp
145 150 155 160

His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser Asn Pro
165 170 175

Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp Phe Ser
180 185 190

Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro His
195 200 205

Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr Lys Asn
210 215 220

Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr Asn Lys
225 230 235 240

Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg Glu Asp
245 250 255

Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln Asn Thr
260 265 270

Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu Thr Ala
275 280 285

Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn Lys Tyr
290 295 300

Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe Ser Glu
305 310 315 320

Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr Lys Leu
325 330 335

Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro Tyr Pro
340 345 350

Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly Gly Val
355 360 365

Pro Val Ile Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu Thr Ser
370 375 380

ES 2 615 732 T3

Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly Val Ala
 385 390 395 400
 Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu Phe Asn
 405 410 415
 Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala Arg Glu
 420 425 430
 Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr Leu Tyr
 435 440 445
 Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu His Leu
 450 455 460
 Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile Thr His
 465 470 475 480
 Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe Gly Thr
 485 490 495
 Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile Pro Val
 500 505 510
 Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr Ile Val
 515 520 525
 Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp Leu Asn
 530 535 540
 Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser Pro Asp
 545 550 555 560
 Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met Ala Thr
 565 570 575
 Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala Val Tyr
 580 585 590
 Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe Gln Phe
 595 600 605
 Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu Asn Asn
 610 615 620
 Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn Ala Asn

ES 2 615 732 T3

Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe Ser Leu
885 890 895

Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg Val Val
900 905 910

Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu Asp Pro
915 920 925

Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg
930 935 940

Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser
945 950 955 960

Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Gln
965 970 975

Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala Glu Ala
980 985 990

Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu
995 1000 1005

Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu
1010 1015 1020

Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile
1025 1030 1035

Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly
1040 1045 1050

Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu
1055 1060 1065

Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys
1070 1075 1080

Asn Ser Leu Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly
1085 1090 1095

Ser Phe Lys Glu Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly
1100 1105 1110

Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala

ES 2 615 732 T3

1115						1120						1125			
Phe Thr	Val Ile Gly Ile	Arg	Lys Ala Phe Asp	Ile	Cys Pro Leu										
1130		1135		1140											
Val Lys	Ile Asp Thr Ala	Leu	Ile Lys Ala Asp	Asn	Phe Leu Leu										
1145		1150		1155											
Glu Asn	Thr Leu Pro Ala	Gln	Ser Thr Phe Thr	Leu	Ala Ile Ser										
1160		1165		1170											
Ala Tyr	Ala Leu Ser Leu	Gly	Asp Lys Thr His	Pro	Gln Phe Arg										
1175		1180		1185											
Ser Ile	Val Ser Ala Leu	Lys	Arg Glu Ala Leu	Val	Lys Gly Asn										
1190		1195		1200											
Pro Pro	Ile Tyr Arg Phe	Trp	Lys Asp Asn Leu	Gln	His Lys Asp										
1205		1210		1215											
Ser Ser	Val Pro Asn Thr	Gly	Thr Ala Arg Met	Val	Glu Thr Thr										
1220		1225		1230											
Ala Tyr	Ala Leu Leu Thr	Ser	Leu Asn Leu Lys	Asp	Ile Asn Tyr										
1235		1240		1245											
Val Asn	Pro Val Ile Lys	Trp	Leu Ser Glu Glu	Gln	Arg Tyr Gly										
1250		1255		1260											
Gly Gly	Phe Tyr Ser Thr	Gln	Asp Thr Ile Asn	Ala	Ile Glu Gly										
1265		1270		1275											
Leu Thr	Glu Tyr Ser Leu	Leu	Val Lys Gln Leu	Arg	Leu Ser Met										
1280		1285		1290											
Asp Ile	Asp Val Ser Tyr	Lys	His Lys Gly Ala	Leu	His Asn Tyr										
1295		1300		1305											
Lys Met	Thr Asp Lys Asn	Phe	Leu Gly Arg Pro	Val	Glu Val Leu										
1310		1315		1320											
Leu Asn	Asp Asp Leu Ile	Val	Ser Thr Gly Phe	Gly	Ser Gly Leu										
1325		1330		1335											
Ala Thr	Val His Val Thr	Thr	Val Val His Lys	Thr	Ser Thr Ser										
1340		1345		1350											

ES 2 615 732 T3

Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile
 1355 1360 1365
 Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg
 1370 1375 1380
 Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu Glu Ser Ser
 1385 1390 1395
 Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu Pro Thr Gly
 1400 1405 1410
 Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val Glu Gly Val
 1415 1420 1425
 Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly His Val Ile
 1430 1435 1440
 Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu Cys Val Arg
 1445 1450 1455
 Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu Ser Pro Ala
 1460 1465 1470
 Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr
 1475 1480 1485
 Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys Glu
 1490 1495 1500
 Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln
 1505 1510 1515
 Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr
 1520 1525 1530
 Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr
 1535 1540 1545
 Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu
 1550 1555 1560
 Leu Asp Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser
 1565 1570 1575
 Glu Ile Thr Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu

ES 2 615 732 T3

1580						1585						1590			
Val	Lys	Gly	Arg	Gln	Tyr	Leu	Ile	Met	Gly	Lys	Glu	Ala	Leu	Gln	
	1595					1600					1605				
Ile	Lys	Tyr	Asn	Phe	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Asp	Ser	
	1610					1615					1620				
Leu	Thr	Trp	Ile	Glu	Tyr	Trp	Pro	Arg	Asp	Thr	Thr	Cys	Ser	Ser	
	1625					1630					1635				
Cys	Gln	Ala	Phe	Leu	Ala	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Ala	Glu	Asp	Ile	
	1640					1645					1650				
Phe	Leu	Asn	Gly	Cys											
	1655														

5
 <210> 3
 <211> 999
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 615 732 T3

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

ES 2 615 732 T3

130						135										140
Asp	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Tyr	Ser	Val	Val	Arg	Gly	Glu	
145					150					155					160	
Gln	Ile	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Thr	Ser	Gly	Met	
				165					170					175		
Gln	Phe	Cys	Val	Lys	Met	Ser	Ala	Val	Glu	Gly	Ile	Cys	Thr	Ser	Glu	
			180					185					190			
Ser	Pro	Val	Ile	Asp	His	Gln	Gly	Thr	Lys	Ser	Ser	Lys	Cys	Val	Arg	
		195					200					205				
Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Val	Thr	Phe	Thr	Val	Leu	
	210						215					220				
Pro	Leu	Glu	Ile	Gly	Leu	His	Asn	Ile	Asn	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Trp	
225					230					235					240	
Phe	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Pro	Glu	Gly	
				245					250					255		
Val	Lys	Arg	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly	Val	Thr	Leu	Asp	Pro	Arg	Gly	Ile	
			260					265					270			
Tyr	Gly	Thr	Ile	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Phe	Pro	Tyr	Arg	Ile	Pro	Leu	
		275					280					285				
Asp	Leu	Val	Pro	Lys	Thr	Glu	Ile	Lys	Arg	Ile	Leu	Ser	Val	Lys	Gly	
	290					295					300					
Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Gly	Ile	
305					310					315					320	
Asn	Ile	Leu	Thr	His	Leu	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Glu	Ala	Glu	Leu	Met	
				325					330					335		
Ser	Val	Val	Pro	Val	Phe	Tyr	Val	Phe	His	Tyr	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	
			340					345					350			
His	Trp	Asn	Ile	Phe	His	Ser	Asp	Pro	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Lys	Leu	
		355					360					365				
Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Gly	Met	Leu	Ser	Ile	Met	Ser	Tyr	Arg	Asn	
	370					375					380					

ES 2 615 732 T3

Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly Gly Ser Ala Ser Thr Trp
385 390 395 400

Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly Gln Val Asn Lys Tyr Val
405 410 415

Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp Leu Val Glu
420 425 430

Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser Gln Tyr Gln
435 440 445

Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg Glu Asn Ser
450 455 460

Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys Ala Phe Asp
465 470 475 480

Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Asp Asn
485 490 495

Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe Thr Leu Ala
500 505 510

Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His Pro Gln Phe
515 520 525

Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val Lys Gly Asn
530 535 540

Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln His Lys Asp Ser
545 550 555 560

Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val Glu Thr Thr Ala Tyr
565 570 575

Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile Asn Tyr Val Asn Pro
580 585 590

Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr
595 600 605

Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly Leu Thr Glu Tyr Ser
610 615 620

Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met Asp Ile Asp Val Ser Tyr
625 630 635 640

ES 2 615 732 T3

Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys Met Thr Asp Lys Asn Phe
 645 650 655
 Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu Ile Val Ser
 660 665 670
 Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr Thr Val Val
 675 680 685
 His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr Leu Lys Ile
 690 695 700
 Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr Gly Asn Ser
 705 710 715 720
 Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro Ser Arg Glu
 725 730 735
 Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile Ser Leu Pro
 740 745 750
 Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu Val Glu Gly
 755 760 765
 Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly His Val Ile
 770 775 780
 Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu Cys Val Arg Phe
 785 790 795 800
 Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu Ser Pro Ala Thr Phe
 805 810 815
 Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr Met Phe Tyr
 820 825 830
 Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Cys
 835 840 845
 Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln Glu Glu Leu Asp Leu
 850 855 860
 Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala Cys Lys Pro Glu Ile
 865 870 875 880
 Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val

ES 2 615 732 T3

				885						890						895
Phe	Val	Lys	Tyr	Lys	Ala	Thr	Leu	Leu	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Gly	Glu	
			900					905					910			
Ala	Val	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Thr	
		915					920					925				
Cys	Thr	Asn	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gln	Tyr	Leu	Ile	Met	Gly	
	930					935					940					
Lys	Glu	Ala	Leu	Gln	Ile	Lys	Tyr	Asn	Phe	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ile	Tyr	
945					950				955						960	
Pro	Leu	Asp	Ser	Leu	Thr	Trp	Ile	Glu	Tyr	Trp	Pro	Arg	Asp	Thr	Thr	
				965					970					975		
Cys	Ser	Ser	Cys	Gln	Ala	Phe	Leu	Ala	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Ala	Glu	
			980					985					990			
Asp	Ile	Phe	Leu	Asn	Gly	Cys										
					995											

5
 <210> 4
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 615 732 T3

Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly Gly Val
 355 360 365

Pro Val Ile Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu Thr Ser
 370 375 380

Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly Val Ala
 385 390 395 400

Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu Phe Asn
 405 410 415

Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala Arg Glu
 420 425 430

Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr Leu Tyr
 435 440 445

Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu His Leu
 450 455 460

Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile Thr His
 465 470 475 480

Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe Gly Thr
 485 490 495

Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile Pro Val
 500 505 510

Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr Ile Val
 515 520 525

Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp Leu Asn
 530 535 540

Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser Pro Asp
 545 550 555 560

Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met Ala Thr
 565 570 575

Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala Val Tyr
 580 585 590

Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe Gln Phe
 595 600 605

ES 2 615 732 T3

Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu Asn Asn
 610 615 620

Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn Ala Asn
 625 630 635 640

Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile Leu
 645 650 655

5
 <210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys
 1 5 10 15

10
 Val Glu Gly Ser Ser
 20

15
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

20
 Lys Ser Ser Lys Cys
 1 5

25
 <210> 7
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

ES 2 615 732 T3

```

Asn Phe Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr
1           5           10           15

Leu Arg Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val
          20           25           30

Thr Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu
          35           40           45

Phe Pro Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys
          50           55           60

Arg Ile Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala
65           70           75           80

Val Leu Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly
          85           90           95

Ser Ala Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe
          100          105          110

His Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp
          115          120          125

```

5
 <210> 8
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

ES 2 615 732 T3

Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys Cys
 1 5 10 15

Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val Thr Phe Thr
 20 25 30

Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe Ser Leu Glu
 35 40 45

Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg Val Val Pro
 50 55 60

Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu Asp Pro Arg
 65 70 75 80

Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg Ile
 85 90 95

Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser Val
 100 105 110

Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Gln Glu
 115 120 125

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

Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu Thr
 145 150 155 160

Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu Lys Gln
 165 170 175

Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile Met Ser Tyr
 180 185 190

Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser
 195 200

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 9

ES 2 615 732 T3

Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met Lys Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr Phe Pro Glu Ser
 20 25 30

<210> 10
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met Lys Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr Phe Pro Glu Ser Trp Leu
 20 25 30

Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys Gln Leu Gln Phe Ala Leu
 35 40 45

Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln Gly Ile Gly Ile Ser Asn
 50 55 60

Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys Ala Lys Val Phe Lys Asp
 65 70 75 80

Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser Val Val Arg Gly Glu Gln
 85 90 95

Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr Arg Thr Ser Gly Met Gln
 100 105 110

Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly Ile Cys Thr Ser Glu Ser
 115 120 125

10

ES 2 615 732 T3

Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys Cys Val Arg Gln
 130 135 140

Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val Thr Phe Thr Val Leu Pro
 145 150 155 160

Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe Ser Leu Glu Thr Trp Phe
 165 170 175

Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg Val Val Pro Glu Gly Val
 180 185 190

Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr
 195 200 205

Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg Ile Pro Leu Asp
 210 215 220

Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser Val Lys Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Gln Glu Gly Ile Asn
 245 250 255

Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala Glu Ala Glu Leu Met Ser
 260 265 270

Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His
 275 280 285

Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys
 290 295 300

Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala
 305 310 315 320

Asp Tyr Ser Tyr Ser
 325

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 615 732 T3

Gly

5 <210> 12
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
 1 5 10 15

Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
 20 25 30

Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
 35 40 45

Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
 50 55 60

Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 65 70

10
 15 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Arg
 20

20
 25 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu
 1 5 10 15

Gln Arg

30 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 615 732 T3

<400> 15

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5 10

5 <210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 16

Val Asn Asn Asp Glu Thr
1 5

15 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 17

Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg
1 5

25 <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

30 Arg Ala Ala

35 <210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

40 Arg Ala

45 <210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

ES 2 615 732 T3

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

Arg

5 <210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

10 <210> 22
<211> 15
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu
1 5 10 15

20 <210> 23
<211> 19
<212> PRT
25 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5 10 15

Ala Ala Arg

30 <210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 24

Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
1 5 10 15

Ala Arg

40 <210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 25

ES 2 615 732 T3

Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
 1 5 10 15

Ala Ala Arg

5 <210> 26
 <211> 925
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

Leu His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser
 1 5 10 15

Tyr Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg
 20 25 30

Lys Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile
 35 40 45

Gln Gly Ile Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr
 65 70 75 80

Ser Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn
 85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu
 100 105 110

Gly Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Ser Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu
 130 135 140

Val Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn

10

ES 2 615 732 T3

Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala
 405 410 415

Leu Ile Lys Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln
 420 425 430

Ser Thr Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp
 435 440 445

Lys Thr His Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu
 450 455 460

Ala Leu Val Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn
 465 470 475 480

Leu Gln His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met
 485 490 495

Val Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp
 500 505 510

Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg
 515 520 525

Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu
 530 535 540

Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met
 545 550 555 560

Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys
 565 570 575

Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn
 580 585 590

Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val
 595 600 605

His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys
 610 615 620

Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr
 625 630 635 640

Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser
 645 650 655

ES 2 615 732 T3

Tyr Lys Pro Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val
 660 665 670
 Met Asp Ile Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu
 675 680 685
 Lys Ala Leu Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile
 690 695 700
 Lys Asp Gly His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp
 705 710 715 720
 Phe Leu Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe
 725 730 735
 Leu Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys
 740 745 750
 Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val
 755 760 765
 Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met
 770 775 780
 Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr
 785 790 795 800
 Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser
 805 810 815
 Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp
 820 825 830
 Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr
 835 840 845
 Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg
 850 855 860
 Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe
 865 870 875 880
 Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr
 885 890 895
 Trp Pro Arg Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn

900

905

910

Leu Asp Glu Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
 915 920 925

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína componente C5 del complemento humano para su uso en: (i) tratar a un paciente aquejado de enfermedad de Degos o (ii) disminuir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad de Degos en un paciente, en el que la enfermedad de Degos es enfermedad de Degos sistémica, multiorgánica.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor del complemento es para administrarse de forma crónica al paciente en una cantidad y con una frecuencia suficientes para mantener un nivel reducido de actividad del complemento en el paciente para tratar de ese modo la enfermedad.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Degos está asociada con una infección por parvovirus B19 o por una infección por virus de la inmunodeficiencia humana.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Degos es idiopática.
- 25 5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Degos afecta patológicamente al tracto gastrointestinal, al sistema nervioso central o al sistema cardiovascular.
- 30 6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Degos es refractaria a al menos una terapia seleccionada del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un anticoagulante, un antitrombótico e inmunoglobulina intravenosa.
- 35 7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la escisión del componente C5 del complemento en los fragmentos C5a y C5b.
- 40 8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es eculizumab.
10. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es para administrarse al paciente junto con un inhibidor de interferón alfa, en el que el inhibidor de interferón alfa es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a interferón alfa o a un receptor de interferón alfa.