

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 912**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/US2011/036552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11143637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11781394 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2569332**

54 Título: **Grupos dirigidos al receptor del complemento 2 (CR2) mejorados**

30 Prioridad:

14.05.2010 US 345035 P

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

26.06.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**KOVACS, JAMES;
HANNAN, JONATHAN P. y
HOLERS, V. MICHAEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 717 912 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

Grupos dirigidos al receptor del complemento 2 (CR2) mejorados.

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/345.035, presentada el 14 de mayo de 2010.

10 CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere a composiciones mejoradas para la administración dirigida de agentes terapéuticos, incluidos inhibidores del complemento, en sitios de inflamación.

15 DECLARACIÓN CON RESPECTO A INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADO POR EL GOBIERNO FEDERAL

La presente invención se realizó en parte durante el trabajo respaldado por la subvención n.º RO1-CA53617 de los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

20 ANTECEDENTES

El receptor del complemento humano 2 (CR2/CD21) es una proteína transmembrana de 145 kiloDalton ("kDa") compuesta por 15 o 16 dominios extracelulares de repeticiones de consenso cortas (SCR), un dominio transmembrana de un solo paso de 28 aminoácidos y un dominio intracelular corto de 34 aminoácidos (1-5). Cada una de las SCR extracelulares comprende aproximadamente 60-70 residuos de aminoácidos y está conectada mediante regiones enlazadoras de tres a ocho residuos de aminoácidos. Todas las SCR contienen un número de residuos de aminoácidos conservados que incluyen cuatro residuos de cisteína, que forman un patrón de puentes disulfuro que conectan Cys1-Cys3 y Cys2-Cys4. El CR2 está presente principalmente en los linfocitos B, donde se encuentra en complejo con otras proteínas de membrana que promueven respuestas inmunitarias celulares y humorales normales (6-9). Utilizando los dominios de SCR ubicados más distalmente (es decir, en el extremo amino), SCR1-2, el CR2 une cuatro clases de ligandos: los fragmentos proteolíticos iC3b, C3dg y C3d del componente del complemento 3 (C3) (10, 11); la glicoproteína gp350/220 (gp350) del virus de Epstein-Barr (EBV) (12-14); el receptor de IgE de baja afinidad CD23 (15, 16), y el interferón alfa citocina (IFN α) (17-19).

El rol principal del CR2 es funcionar como un correceptor de linfocitos B para la activación de linfocitos B mediada por antígenos a través de la transducción de señal mejorada (20, 21). Esta función se lleva a cabo a través de la coligación mediante el C3d y la IgM de superficie, cuando el C3d está unido de forma covalente a un antígeno (22-28). El CR2 también es el receptor celular estricto para el EBV a través de su glicoproteína de superficie de membrana gp350 (12, 20, 29-31). La infección con EBV celular real se logra después de que la ligación de CR2 a gp350 sujeta el virus lo suficientemente cerca de la superficie de la célula (14, 32, 33), lo que permite que el gp42 viral se una a las moléculas de clase II de antígeno de leucocitos humanos (34, 35) y posteriormente active la fusión de la célula hospedadora a través de tres glicoproteínas virales adicionales gB, gH y gL (36-38). Se ha demostrado que IFN α es un ligando de CR2, aunque la importancia fisiológica de esta interacción sigue siendo incierta (17-19). Se ha sugerido, sin embargo, que IFN α y CR2 pueden participar en el desarrollo de la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico (39-41).

Los estudios de mutagénesis, junto con los estudios estructurales de la interacción CR2-gp350 han sugerido residuos en CR2 que son necesarios para la interacción (20, 42, 43). Se utilizó ELISA y citometría de flujo para evaluar los mutantes de CR2 candidatos para la unión de gp350 y CR2 (20, 42, 43). En estudios recientes, residuos específicos en CR2 que se ha descubierto que tienen un efecto perjudicial sobre la unión de gp350 cuando mutan incluyeron R13, S15, R28, R36, K41, K57, K67, R83 y R89 (42, 43). En un trabajo separado, los residuos P8-S15 dentro de la primera región intercisteína conservada de SCR1 y la región enlazadora entre SCR1 y SCR2 también se destacan como esenciales para que se produzca la unión de gp350 (20). Estos datos, junto con los análisis de mutagénesis separados dirigidos a la molécula de gp350 se utilizaron para activar un modelo *in silico* de la interacción CR2-gp350 utilizando el programa de acoplamiento suave HADDOCK (43-45). Este análisis sugirió que la interacción primaria en CR2 fue entre SCR1 y la región enlazadora que une SCR1 a SCR2, y para gp350, la región enlazadora entre el dominio 1 y el dominio 2 (43).

CR2 se ha sugerido como un receptor para IFN α por el hallazgo de que IFN α imita la unión de gp350 y C3d, y la observación de que los tres ligandos se unen a una región similar en CR2 (18, 19). El mimetismo también demostró ser funcional (18). Después de que las estructuras C3d e IFN α se resolvieron, se descubrió que la secuencia de unión de CR2 putativa tenía motivos estructurales similares. IFN α se ha descrito como capaz de unirse a múltiples formas de CR2 desde longitud completa a SCR1-2, aunque en diferentes grados (17). Aunque se ha demostrado que CR2 es un receptor para IFN α , el sitio de unión a IFN α dentro de CR2 SCR1-2 se desconoce.

Otros análisis de las interacciones de CR2 con ligandos conocidos para identificar residuos de aminoácidos

específicos que participan en la unión a estos ligandos permitirían el diseño de moléculas de CR2 modificadas con especificidad de unión definida para cada ligando de CR2 conocido (p. ej., fragmentos proteolíticos de C3 iC3b, C3dg y C3d; glicoproteína de EBV gp350; CD23; e IFN α).

- 5 WO 2004/045520 y WO 2007/149567 describe proteínas de fusión que comprenden una parte de CR2 y una parte del modulador. Sin embargo, estas proteínas de fusión no comprenden una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350.

RESUMEN

10

Se proporcionan en la presente composiciones y procedimientos dirigidos a proteínas solubles que pueden administrar selectivamente moduladores de actividad del complemento. La administración dirigida de estos moduladores se logra mediante la mutación de forma selectiva de aminoácidos específicos en una parte de proteína de direccionamiento de la composición que corresponde a al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de CR2. Según la combinación específica de mutaciones introducidas en la parte de direccionamiento, un modulador de actividad del complemento se puede administrar selectivamente a ligandos específicos de CR2 en sitios donde se desea la activación o la supresión del sistema del complemento.

15

En consecuencia, en un aspecto, se proporcionan en la presente composiciones solubles capaces de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de dicha construcción que comprende al menos los dos primeros dominios de repeticiones de consenso cortas de extremo N (SCR) de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento de dicha construcción; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 con respecto a una construcción en la cual la parte de CR2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 y donde la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en N11 o Y64 de SEQ ID NO: 2. También se describen composiciones solubles que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO: 1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67.

20

25

30

En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión.

35

En determinadas realizaciones, la parte del modulador del complemento comprende un inhibidor del complemento. En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento es o comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína del complemento de membrana humana (MCP)(SEQ ID NO:10), factor de aceleración del deterioro humano (DAF) (SEQ ID NO:11), DAF de ratón (SEQ ID NO:12), gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Crry) (SEQ ID NO:4), CD59 humana (SEQ ID NO:3), isoforma A de CD59 de ratón (SEQ ID NO:6), isoforma B de CD59 de ratón (SEQ ID NO:7), receptor del complemento humano 1 (CR1) (SEQ ID NO:9), factor H humano (SEQ ID NO:5) y factor H de ratón (SEQ ID NO:8).

40

En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende la proteína del complemento de membrana humana (MCP) (SEQ ID NO:10) o un fragmento biológicamente activo de esta. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la MCP humana (SEQ ID NO:10) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 35-285 de SEQ ID NO:10), SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina (aminoácidos 35-326 de SEQ ID NO:10) y el dominio extracelular de MCP (aminoácidos 35-343 de SEQ ID NO:10). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende DAF humano (SEQ ID NO:11) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de DAF humano (SEQ ID NO:11) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 25-285 de SEQ ID NO:11) y SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina O-glicosilado (aminoácidos 25-353 de SEQ ID NO:11). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende DAF de ratón (SEQ ID NO:12) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de DAF de ratón (SEQ ID NO:12) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 35-286 de SEQ ID NO:12) y SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina O-glicosilado (aminoácidos 35-362 de SEQ ID NO:12). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende Crry (SEQ ID NO:4) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de Crry (SEQ ID NO:4) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-5 (aminoácidos 41-400 de SEQ ID NO:4) y la proteína Crry de ratón de dominio extracelular (aminoácidos 41-405 de SEQ ID NO:4). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende CD59 humana (SEQ ID NO:3) o un fragmento biológicamente activo de esta. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de CD59 humana (SEQ ID NO:3) comprende el dominio extracelular de CD59 humana que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos 26-101 de SEQ ID NO:3). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende la isoforma A de CD59 de ratón (SEQ ID NO:6) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la isoforma A de CD59 de ratón (SEQ ID NO:6) comprende el dominio extracelular de la isoforma A de CD59 de ratón que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos

50

55

60

65

24-95 de SEQ ID NO:6). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende la isoforma B de CD59 de ratón (SEQ ID NO:7) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la isoforma B de CD59 de ratón (SEQ ID NO:7) comprende el dominio extracelular de la isoforma B de CD59 de ratón que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos 24-103 de SEQ ID NO:7). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende CR1 humano (SEQ ID NO:9) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de CR1 humano (SEQ ID NO:9) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-3 (aminoácidos 42-234 de SEQ ID NO:9), SCR1-4 (aminoácidos 42-295 de SEQ ID NO:9), SCR1-10 (aminoácidos 42-684 de SEQ ID NO:9), SCR8-10 (aminoácidos 491-684 de SEQ ID NO:9), SCR 8-11 (aminoácidos 491-745 de SEQ ID NO:9), SCR15-17 (aminoácidos 941-1134 de SEQ ID NO:9), SCR15-18 (aminoácidos 941-1195 de SEQ ID NO:9) y SCR22-28 (aminoácidos 1394-1842 de SEQ ID NO:9). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende el factor H humano (SEQ ID NO:5) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del factor H humano (SEQ ID NO:5) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 21-262 de SEQ ID NO:5), SCR1-5 (aminoácidos 21-320 de SEQ ID NO:5), SCR1-8 (aminoácidos 21-507 de SEQ ID NO:5) y SCR1-18 (aminoácidos 21-1104 de SEQ ID NO:5). En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende factor H de ratón (SEQ ID NO:8) o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de factor H de ratón (SEQ ID NO:8) se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 19-264 de SEQ ID NO:8), SCR1-5 (aminoácidos 19-322 de SEQ ID NO:8), SCR1-8 (aminoácidos 19-507 de SEQ ID NO:8) y SCR1-18 (aminoácidos 19-1109 de SEQ ID NO:8).

En determinadas realizaciones, la parte del modulador del complemento comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el activador del complemento o el fragmento biológicamente activo de este se selecciona del grupo que consiste en IgG₁ humana, dominio Fc de IgG₁ humana, IgM humana, dominio Fc de IgM humana, IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgG₃ de ratón, IgM de ratón, dominio Fc de IgM de ratón y factor de veneno de cobra (CVF).

De acuerdo con la invención, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 con respecto a una construcción en la cual la parte de CR2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, donde la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en N11 o Y64 de SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la construcción presenta afinidad de unión disminuida para IFN α en comparación con una construcción en la cual la parte de CR2 no contiene ninguna sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos una sustitución de aminoácido para un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50 de SEQ ID NO:2.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente procedimientos para reducir la afinidad de unión de una construcción para EBV-gp350, donde la construcción comprende: (a) una parte de CR2 que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR cortas de extremo N de CR2; y (b) una parte del modulador del complemento, donde dicho procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido de la parte de CR2 seleccionada del grupo que consiste en N11, y Y64 de SEQ ID NO:2.

Se describen en la presente procedimientos para reducir la afinidad de unión de una construcción que comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la parte de CR2; y (b) una parte del modulador del complemento, para EBV-gp350, que comprende mutar al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N11, R36, K41, Y64 y K67.

La descripción proporciona procedimientos para reducir la afinidad de unión de una construcción que comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la parte de CR2; y (b) una parte del modulador del complemento, para IFN α , que comprende mutar al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S42 y K50.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Los análisis de titulación de NMR revelan que SCR1 y SCR2 de CR2 participan ambos en la ligación de gp350. Dos espectros de espectroscopia optimizada de relajación transversal ¹H-¹⁵N-coherencia cuántica simple heteronuclear (TROSY-HSQC) superpuestos de CR2 SCR1-2 marcado con ¹⁵N (0,6 mM en 1/3X PBS) recogido durante la titulación con cantidades crecientes de gp350. Negro, sin gp350 y gris, cantidades saturantes de gp350. Recuadro, vista detallada de cambio de desplazamiento químico. El esquema de numeración que se utiliza aquí para CR2 se basa en la secuencia de aminoácidos para la proteína madura.

Figura 2. Los análisis de titulación de NMR revelan que SCR1 y SCR2 de CR2 participan ambos en la ligación de IFN α . Cinco espectros de ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC superpuestos de CR2 SCR1-2 marcado con ¹⁵N (0,6 mM en 1/3X PBS) recogido durante la titulación con cantidades crecientes de IFN α .

Figura 3. Comparación de residuos de unión al ligando de CR2 derivado de NMR. El histograma ilustra los cambios de desplazamiento químico inducidos en las amidas de la estructura principal de CR2 SCR1-2 tras la unión de C3d, IFN α o gp350.

Figuras 4A, 4B y 4C. Representación superficial de estructura cristalina de rayos X de CR2 SCR1-2 en su

estado unido a ligando (C3d no se muestra) con residuos de unión a ligando determinados por NMR. Figura 4A. Residuos de unión a gp350 determinados por NMR. Los residuos grises representan los residuos no afectados por la titulación de gp350. Los residuos negros en SCR1, la región enlazadora y SCR2 representan residuos que participan en la unión de gp350 a CR2 SCR1-2. Figura 4B. Residuos de unión a IFN α determinados por NMR. Los residuos grises representan los residuos no afectados por la titulación de IFN α . Los residuos negros en SCR1, la región enlazadora y SCR2 representan residuos que participan en la unión de IFN α a CR2 SCR1-2. Figura 4C. Residuos de unión exclusivos y compartidos de ligando determinado por NMR. Los residuos negros representan los residuos que participan de forma exclusiva en la unión de CR2 a IFN α y gp350. Los residuos grises oscuros representan los residuos que participan de forma exclusiva en la unión de CR2 a C3d. Los residuos grises claros representan residuos que participan en los tres eventos de unión al ligando de CR2.

Figura 5. Modelo de acoplamiento CR2-gp350 HADDOCK con residuos de unión al ligando de CR2-gp350 derivado de NMR resaltados. Modelo de Young y col. (43). Las cintas negras representan gp350 y el gris claro representa grupos glicosilo que decoran la superficie de gp350. Las cintas grises oscuras representan CR2 SCR1-2. Recuadro, vista ampliada de las interacciones teóricas de la cadena lateral entre los residuos de unión derivados de NMR y gp350 mapeado en el modelo de acoplamiento de Young y col.

Tabla 1. Constantes de unión de CR2 de titulaciones de NMR e ITC. Se muestran constantes de unión débil y de límite superior a unión fuerte para interacciones de ligando de CR2 determinadas utilizando titulaciones de NMR monitorizando cambios de desplazamiento químico. También se muestran constantes de unión de ligando CR2 determinadas utilizando ITC. UL, límite superior. ITC, calorimetría de titulación isotérmica.

Tabla 2. Comparación de residuos de unión al ligando de CR2. Se muestran los residuos que participan en cada interacción de unión al ligando de CR2. Los residuos con un asterisco son exclusivos de la interacción de unión respectiva.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos completa del receptor del complemento humano 2 (CR2).
 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos completa de los dominios 1 y 2 de repeticiones de consenso cortas (SCR) de CR2 humano.
 SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD59 humana.
 SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos completa del gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Crry).
 SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos completa de factor H humano.
 SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD59A de ratón.
 SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos completa de la proteína CD59B de ratón.
 SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos completa del factor H de ratón.
 SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos completa del receptor del complemento humano 1 (CR1).
 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos completa de la proteína de cofactor de membrana humana (MCP).
 SEQ ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos completa del factor de aceleración del deterioro humano (DAF/CD55).
 SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos completa del factor de aceleración del deterioro de ratón (DAF/CD55).
 SEQ ID NO:13 es la secuencia de aminoácidos completa del factor de veneno de cobra (CVF) de la cobra de monóculo (*Naja kaouthia*).
 SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de IgG₁ humana, dominio C.
 SEQ ID NO:15 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de IgG₁ ligera, dominio C.
 SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos completa del dominio Fc de IgG₁ humana.
 SEQ ID NO:17 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de IgM humana, dominio C.
 SEQ ID NO:18 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera de IgM humana, dominio C.
 SEQ ID NO:19 es la secuencia de aminoácidos completa del dominio Fc de IgM humana.
 SEQ ID NO:20 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de IgG₃ de ratón, dominio C.
 SEQ ID NO:21 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera de IgG₃ de ratón, dominio C.
 SEQ ID NO:22 es la secuencia de aminoácidos completa del dominio Fc de IgG₃ de ratón.
 SEQ ID NO:23 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de IgM de ratón, dominio C.
 SEQ ID NO:24 es la secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera de IgM de ratón, dominio C.
 SEQ ID NO:25 es la secuencia de aminoácidos completa del dominio Fc de IgM de ratón.
 SEQ ID NO:26 es una secuencia enlazadora entre los dos primeros SCR de extremo N del CR2 humano.
 SEQ ID NO:27 es una secuencia enlazadora entre los dos primeros SCR de extremo N del CR2 humano.
 SEQ ID NO:28 es una secuencia enlazadora entre el cuarto y el quinto dominio de repetición de consenso corto de extremo N de CR2 humano.

60

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El complemento es un componente importante de la inmunidad, pero la activación inapropiada y excesiva del sistema del complemento está implicada en numerosas condiciones patológicas e inflamatorias. Los productos de activación del complemento que median la lesión tisular se generan en diversos puntos de la vía del complemento. La activación del complemento en las superficies celulares produce la escisión del componente 3 del complemento sérico (C3) y la

65

unión covalente de fragmentos de C3 que sirven como opsoninas para las células efectoras inmunitarias en las superficies celulares. Los fragmentos de C3 resultantes incluyen C3a, un péptido soluble que es una anafilatoxina potente, y C3b, un componente de la vía del complemento alternativa C3 convertasa. Posteriormente, el componente 5 del complemento sérico (C5) se escinde para liberar C5a soluble, otra anafilatoxina y quimioatrayente potente con una amplia gama de propiedades bioactivas. La escisión de C5 también inicia la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), un complejo proteico citolítico que se reúne en las membranas celulares, lo que finalmente produce la lisis de las células opsonizadas.

El componente 3 del complemento (C3) es un zimógeno. El C3 intacto circula a concentraciones altas (1-2 mg/ml).M. Janzi y col., Mol. Cell. Proteomics (2005) 4(12):1942-1947. Durante la activación del complemento, el C3 completo se escinde para formar C3b, un componente de la vía alternativa del complemento C3 convertasa, que se une de manera covalente a las superficies diana. Las proteínas reguladoras del complemento endógeno inactivan C3b unido al tejido para formar iC3b y finalmente el fragmento C3d de 35 kilodalton ("kD"). El fragmento C3d permanece fijado a los tejidos y sirve como marcador duradero de la inflamación mediada por el complemento. I. Leivo y col., J. Cell. Biol. (1986) 103:1091-1100.

La administración dirigida de inhibidores del complemento a los sitios de activación del complemento y de la enfermedad puede mejorar su eficacia. Dado que el complemento cumple una función importante en la defensa del hospedador y en la formación de la inmunidad, así como en los mecanismos homeostáticos inmunitarios como el catabolismo de complejo inmunitario y la depuración de las células apoptóticas, la administración dirigida de inhibidores del complemento reduce los efectos secundarios potencialmente graves que se derivan de la inhibición sistémica del complemento, en particular, la inhibición del complemento a largo plazo.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica, y química de ácido nucleico que son muy conocidas por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican de forma detallada en la bibliografía, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russell, 2001), (que se denominan en conjunto en la presente "Sambrook"); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987, incluidos los suplementos hasta 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000); Handbook of Experimental Immunology, 4.º edición (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); y Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987).

Receptor del complemento 2

El receptor del complemento 2 humano, también denominado CD21 (CR2/CD21) (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2), es una proteína transmembrana de ~145 kD de la familia de proteínas de unión a C3 que comprende 15 o 16 dominios de repetición de consenso cortos (SCR), unidades estructurales características de dichas proteínas. CR2 se expresa en células B maduras y células dendríticas foliculares, y cumple una función importante en la inmunidad humoral. J. Hannan y col., Biochem. Soc. Trans. (2002) 30:983-989; K.A. Young y col., J. Biol. Chem. (2007) 282(50):36614-36625. La proteína CR2 no se une a la proteína C3 intacta, pero se une a sus productos de descomposición, incluidos los fragmentos de escisión de C3b, iC3b y C3d, a través de un sitio de unión ubicado dentro de las dos primeras repeticiones de consenso cortas de extremo amino ("SCR 1-2") de la proteína CR2. En consecuencia, el dominio SCR1-2 de CR2 discrimina entre las formas escindida (es decir, activada) de C3 y C3 circulante intacto. Como grupo dirigido, SCR 1-2 de CR2 por lo tanto son capaces de discriminar entre C3 circulante y los fragmentos de C3 generados durante la activación del complemento. Mientras que la afinidad de CR2 por C3d es de solo 620-658 nM (J. Hannan y col., Biochem. Soc. Trans. (2002) 30:983-989; J.M. Guthridge y col., Biochem. (2001) 40:5931-5941), la avidez de CR2 por C3d agrupado lo convierte en un procedimiento efectivo de direccionamiento de moléculas a sitios de activación del complemento.

La escisión de C3 produce inicialmente la generación y el depósito de C3b en la superficie celular de activación. El fragmento de C3b participa en la generación de complejos enzimáticos que amplían la cascada del complemento. En una superficie celular, C3b se convierte rápidamente en iC3b inactivo, en particular cuando se deposita en una superficie del hospedador que contiene reguladores de activación del complemento (es decir, la mayoría de los tejidos hospedadores). Incluso cuando no hay reguladores del complemento unido a la membrana, se forman niveles sustanciales de iC3b debido a la acción del factor sérico H y el factor sérico I. iC3b se digiere posteriormente a los fragmentos C3dg unidos a la membrana y después C3d por el factor I y otras proteasas y cofactores, pero este proceso es relativamente lento. Por lo tanto, los ligandos C3 para CR2 tienen una vida relativamente larga una vez generados y están presentes en concentraciones altas en sitios de activación del complemento.

Definiciones

La referencia general a "la composición" o "las composiciones" incluye y se aplica a las composiciones de la invención.

Como se usa en el presente documento, la forma singular de los artículos "uno", "una", y "el", incluye referencias en plural a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, la frase "un fragmento CR2 biológicamente activo" incluye uno o más fragmentos CR2 biológicamente activos.

- 5 La referencia a "aproximadamente" un valor o un parámetro de la presente incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a dicho valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención descritos en la presente incluyen que consiste y/o
10 que consiste esencialmente en aspectos y realizaciones.

Tal como se usa en la presente, el término "individuo" se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales para investigación, animales domésticos, animales de granja, animales para deportes, mascotas, primates, ratones y ratas. En determinadas
15 realizaciones, el individuo es un ser humano. En determinadas realizaciones, el individuo es un individuo diferente de un ser humano. En determinadas realizaciones, el individuo es un modelo animal para el estudio de una enfermedad en la cual participan vías del complemento alternativas.

Se pretende que cada limitación numérica máxima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluya cada una de
20 las limitaciones numéricas inferiores, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran escritas expresamente en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada una de las limitaciones numéricas superiores, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran escritas expresamente en el presente documento. Cada intervalo numérico dado a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada uno de los intervalos numéricos más estrechos que caen dentro de dicho
25 intervalo numérico más amplio, como si todos esos intervalos numéricos más estrechos estuvieran expresamente escritos en la presente.

Sustituciones de aminoácidos

- 30 En las proteínas se encuentran comúnmente veinte aminoácidos. Estos aminoácidos se pueden agrupar en nueve clases o grupos basándose en las propiedades químicas de sus cadenas laterales. La sustitución de un residuo de aminoácidos por otro dentro de la misma clase o grupo se denomina en la presente sustitución "conservadora". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se pueden realizar con frecuencia en una proteína sin alterar significativamente la conformación o la función de la proteína. La sustitución de un residuo de aminoácidos por otro
35 de una clase o un grupo diferente se denomina en la presente sustitución "no conservadora". En cambio, las sustituciones de aminoácidos no conservadoras tienden a alterar la conformación y la función de una proteína.

Tabla 3: ejemplo de clasificación de aminoácidos

Residuos pequeños/alifáticos:	Gly, Ala, Val, Leu, Ile
Iminoácido cíclico:	Pro
Residuos que contienen hidroxilo:	Ser, Thr
Residuos ácidos:	Asp, Glu
Residuos de amidas:	Asn, Gln
Residuos básicos:	Lys, Arg
Residuo de imidazol:	His
Residuos aromáticos:	Phe, Tyr, Trp
Residuos que contienen azufre:	Met, Cys

- 40 En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos conservadora comprende sustituir cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquier otro de estos aminoácidos alifáticos; serina (S) por treonina (T) y viceversa; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) por asparagina (N) y viceversa; lisina (K) por arginina (R) y viceversa; fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W) por cualquier otro de estos aminoácidos aromáticos; y metionina (M) por cisteína (C) y viceversa. Otras sustituciones también se pueden
45 considerar conservadoras, dependiendo del entorno del aminoácido en particular y su función en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) con frecuencia pueden ser intercambiables, así como alanina (A) y valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrofóbica, con frecuencia se puede intercambiar por leucina e isoleucina, y a veces con valina. La lisina (K) y la arginina (R) con frecuencia son intercambiables en ubicaciones en las cuales la característica significativa del residuo de aminoácido es su carga y
50 los diferentes pK de estos dos residuos de aminoácidos no son significativos. Otros cambios también se pueden considerar "conservadores" en entornos particulares (véase, p. ej., BIOCHEMISTRY en las págs. 13-15, 2.º ed. Lubert Stryer ed. (Stanford University); Henikoff y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA (1992) 89:10915-10919; Lei y col., J. Biol. Chem. (1995) 270(20):11882-11886).
- 55 En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquiera de serina (S), treonina (T), ácido aspártico

(D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de serina (S) y treonina (T) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L), serina (S), treonina (T), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de glutamina (Q) y asparagina (N) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L) por cualquiera de serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de lisina (K) y arginina (R) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L) por cualquiera de serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L) serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), metionina (M), cisteína (C), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir cualquiera de metionina (M) y cisteína (C) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L), serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir histidina (H) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L), serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y prolina (P). En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos no conservadora comprende sustituir prolina (P) por cualquiera de glicina (G), alanina (A), isoleucina (I), valina (V), leucina (L), serina (S), treonina (T), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glutamina (Q), asparagina (N), lisina (K), arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) e histidina (H).

Moduladores de actividad del complemento

Tal como se usa en la presente, la expresión "modulador del complemento" se refiere a un compuesto, una composición o una proteína que modula (p. ej., inhibe o activa) la actividad del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. Un modulador del complemento puede ser un inhibidor del complemento o un activador del complemento.

Tal como se usa en la presente, la expresión "inhibidor del complemento" se refiere a cualquier compuesto, composición o proteína que reduce o elimina la actividad del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. La reducción de la actividad del complemento puede ser gradual (p. ej., una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad) o completa. Un inhibidor del complemento puede ser una proteína soluble o unida a membrana tal como, por ejemplo, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor de aceleración del deterioro (DAF/CD55), CD59, gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Cry), receptor del complemento humano 1 (CR1) y factor H o un anticuerpo específico para un componente de una vía del complemento tal como, por ejemplo, eculizumab (un anticuerpo anti-C5 comercializado con la marca Soliris®), pexelizumab (un anticuerpo de cadena simple (scFv) que comprende el fragmento de unión a antígeno de eculizumab), un anticuerpo anti-factor B (tal como el anticuerpo monoclonal 1379 producido por ATCC n.º de depósito PTA-6230), un anticuerpo anti-properdina, un anticuerpo anti-factor D y similares. Alternativamente, un inhibidor del complemento puede ser una molécula pequeña o un péptido lineal o cíclico tal como, por ejemplo, compestatina, ácido N-acetilpartilglutámico (NAAGA) y similares.

Tal como se usa en la presente, la expresión "activador del complemento" se refiere a cualquier compuesto, composición o proteína que aumenta o activa la actividad del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. El aumento de la actividad del complemento puede ser gradual (p. ej., un aumento del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad). Un activador del complemento puede ser una proteína soluble o unida a membrana tal como, por ejemplo, isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃ (IgG₃) y Fc de IgM de ratón, así como factor de veneno de cobra (CVF) y fragmentos biológicamente activos de este, tales como el dominio Fc de proteínas Ig, tal como el dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón y dominio Fc de IgM de ratón. Los activadores del complemento también pueden incluir, por ejemplo, moléculas de CVF híbridas que comprenden una parte de CVF y una parte del componente 3 del complemento (C3), tal como las que se describen en Fritzing y col., "Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion," *Develop. Comp. Immunol.* 33(1):105-116 (2009). Estos híbridos comprenden proteínas en las cuales los 113 o 315 residuos de extremo C de C3 se reemplazaron con secuencias de CVF correspondientes.

Proteínas del inhibidor del complemento

Se proporcionan en la presente composiciones solubles tal como se definen en las reivindicaciones que comprenden una construcción, en donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del inhibidor del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En particular, la invención se refiere a una composición soluble capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de dicha construcción que comprende al menos los dos primeros dominios de repeticiones de consenso cortas de extremo N (SCR) de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento de dicha construcción; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 con respecto a una construcción en la cual la parte de CR2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 y donde la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en N11 o Y64 de SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. Se ha identificado una cantidad de proteínas endógenas solubles y unidas a membrana que inhiben el complemento. Estas proteínas inhibitoras del complemento incluyen, entre otras, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor de aceleración del deterioro (DAF/CD55), CD59, gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Crry), receptor del complemento humano 1 (CR1) y factor H. En determinadas realizaciones, la parte del modulador del complemento de la construcción comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. En determinadas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en MCP humana, DAF humano, DAF de ratón, CD59 humana, isoforma A de CD59 de ratón, isoforma B de CD59 de ratón, proteína Crry de ratón, CR1 humano, factor H humano o factor H de ratón o un fragmento biológicamente activo de este.

Proteína de cofactor de membrana (MCP)

Tal como se usa en la presente, la expresión "proteína de cofactor de membrana", "MCP" o "CD46" se refiere a una glicoproteína de superficie celular de unión a C3b/C4b ampliamente distribuida que inhibe la activación del complemento en células hospedadoras y actúa como cofactor para la escisión mediada por el factor I de C3b y C4b, incluidos sus homólogos. T.J. Oglesby y col., J. Exp. Med. (1992) 175:1547-1551. MCP pertenece a una familia conocida como los reguladores de la activación del complemento ("RCA"). Los miembros de la familia comparten determinadas características estructurales, que comprenden diversas cantidades de dominios de repetición de consenso cortas (SCR), que tienen típicamente entre 60 y 70 aminoácidos de longitud. Comenzando en el extremo amino, MCP comprende cuatro SCR, una región enriquecida con serina/treonina/prolina, un área de función indefinida, un dominio hidrofóbico transmembrana, un ancla citoplásmica y una cola citoplásmica. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que la MCP humana o los fragmentos biológicamente activos de esta abarcan todas las especies y variaciones de cepas.

SEQ ID NO:10 representa la secuencia de aminoácidos de MCP humana de longitud completa (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P15529). Los aminoácidos 1-34 corresponden al péptido señal, los aminoácidos 35-343 corresponden al dominio extracelular, los aminoácidos 344-366 corresponden al dominio transmembrana y los aminoácidos 367-392 corresponden al dominio citoplásmico. En el dominio extracelular, los aminoácidos 35-96 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 97-159 corresponden a SCR 2, los aminoácidos 160-225 corresponden a SCR 3, los aminoácidos 226-285 corresponden a SCR 4 y los aminoácidos 302-326 corresponden al dominio rico en serina/treonina. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que la MCP o los fragmentos biológicamente activos de esta abarcan todas las especies y variaciones de cepas. Tal como se usa en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" de MCP se refiere a cualquier fragmento soluble que carece del dominio citoplásmico y del dominio transmembrana, incluidos fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en 1, 2, 3 o 4 dominios SCR, con o sin el dominio rico en serina/treonina, que tienen parte o la totalidad de la actividad del inhibidor del complemento de la proteína de MCP humana de longitud completa. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento comprende MCP humana de longitud completa (aminoácidos 35-392 de SEQ ID NO:10), el dominio extracelular de MCP humana (aminoácidos 35-343 de SEQ ID NO:10) o SCR 1-4 de MCP humana (aminoácidos 35-285 de SEQ ID NO:10).

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) MCP; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b

que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada, y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende MCP humana de longitud completa (SEQ ID NO:10). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de MCP humana de longitud completa (SEQ ID NO:10). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la MCP humana se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 35-285 de SEQ ID NO:10), SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina (aminoácidos 35-326 de SEQ ID NO:10) y el dominio extracelular de MCP (aminoácidos 35-343 de SEQ ID NO:10).

25

Factor de aceleración del deterioro (DAF)

El factor de aceleración del deterioro, también denominado CD55 (DAF/CD55) (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12), es una glicoproteína unida a membrana de ~70 kiloDalton (kDa) que inhibe la activación del complemento en células hospedadoras. De forma similar a varias proteínas reguladoras del complemento diferentes, el DAF comprende varios motivos de repetición de aproximadamente 60 aminoácidos denominados repeticiones de consenso cortas (SCR).

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "factor de aceleración del deterioro," "DAF" o "CD55" se refiere a una glicoproteína de membrana de setenta kilodalton ("kD") que comprende cuatro dominios de repetición de consenso cortos (SCR) seguidos de un dominio rico en serina/treonina altamente O-glicosilado en el extremo C que eleva la molécula de la superficie de membrana, seguido de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol ("GPI"). El DAF protege la superficie celular de la activación del complemento mediante la disociación de las convertasas C3 unidas a membrana que son necesarias para escindir la proteína del complemento C3 y para amplificar la cascada del complemento. El DAF evita el ensamblaje o acelera el deterioro de las convertasas C3 y C5 de las vías del complemento alternativas y clásicas.

SEQ ID NO:11 representa la secuencia de aminoácidos de DAF humano de longitud completa (véase, *p. ej.*, UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P08173); SEQ ID NO:12 representa la secuencia de aminoácidos de DAF de ratón de longitud completa (véase, *p. ej.*, UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso Q61475). En la secuencia de DAF humano, los aminoácidos 1-34 corresponden al péptido señal, los aminoácidos 35-353 aparecen en la proteína madura y los aminoácidos 354-381 se eliminan del polipéptido después de la traducción. Dentro de la proteína madura, los aminoácidos 35-96 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 96-160 corresponden a SCR 2, los aminoácidos 161-222 corresponden a SCR 3, los aminoácidos 223-285 corresponden a SCR 4 y los aminoácidos 287-353 corresponden al dominio rico en serina/treonina O-glicosilado. El anclaje de GPI se une al DAF humano en una serina en la posición 353. En la secuencia de DAF de ratón, los aminoácidos 1-34 corresponden al péptido señal, los aminoácidos 35-362 aparecen en la proteína madura y los aminoácidos 363-390 se eliminan del polipéptido después de la traducción. Dentro de la proteína madura, los aminoácidos 35-96 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 97-160 corresponden a SCR 2, los aminoácidos 161-222 corresponden a SCR 3, los aminoácidos 223-286 corresponden a SCR 4 y los aminoácidos 288-362 corresponden al dominio rico en serina/treonina O-glicosilado. El anclaje de GPI se une al DAF de ratón en una serina en la posición 362. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que el DAF o los fragmentos biológicamente activos de este abarcan todas las especies y variaciones de cepas. Tal como se utiliza en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" de DAF se refiere a cualquier fragmento de DAF que carezca de un anclaje de GPI y/o el aminoácido al cual se une (es decir, Ser-353), incluido cualquier fragmento de la proteína de DAF de longitud completa que comprenda, consista esencialmente o consista en 1, 2, 3 o 4 dominios de SCR, con o sin el dominio rico en serina/treonina O-glicosilado, que tenga parte o toda la actividad inhibitoria del complemento de la proteína de DAF de longitud completa.

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) DAF; donde la parte de

CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende DAF humano de longitud completa. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de DAF humano de longitud completa (SEQ ID NO:11). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de DAF humano se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 25-285 de SEQ ID NO:11) y SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina O-glicosilado (aminoácidos 25-353 de SEQ ID NO:11). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende DAF de ratón de longitud completa (SEQ ID NO:12). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de DAF de ratón de longitud completa. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de DAF de ratón se selecciona del grupo que consiste en SCR1-4 (aminoácidos 35-286 de SEQ ID NO:12) y SCR1-4 más el dominio rico en serina/treonina O-glicosilado (aminoácidos 35-362 de SEQ ID NO:12).

CD59

Tal como se utiliza en la presente, el término "CD59" se refiere a una glicoproteína de 128 aminoácidos unida a membrana que inhibe potencialmente el complejo de ataque de membrana (MAC) del complemento. La CD59 actúa mediante la unión a los componentes C8 y/o C9 del MAC durante el ensamblaje, lo que finalmente evita la incorporación de las múltiples copias de C9 necesarias para la formación completa del poro osmótico en el corazón del MAC. La CD59 es N- y O-glicosilada. La N-glicosilación comprende principalmente estructuras bi o triantennarias con o sin lactosamina y residuos de fucosa del brazo externo, con sialilación variable presente en algunos sitios. De manera similar al DAF, la CD59 se ancla en la membrana celular mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol ("GPI") anchor, que está unido a una asparagina en el aminoácido 102. Se han producido formas solubles de CD59 (sCD59), pero generalmente tienen baja actividad funcional *in vitro*, particularmente en presencia de suero, lo que sugiere que esa sCD59 no modificada tiene poca o no tiene eficacia terapéutica. Véase, *p. ej.*, S. Meri y col., "Structural composition and functional characterization of soluble CD59: heterogeneity of the oligosaccharide and glycoposphoinositol (GPI) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis," *Biochem. J.* 316:923-935 (1996).

SEQ ID NO:3 representa la secuencia de aminoácidos de CD59 humana de longitud completa (véase, *p. ej.*, UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P13987); SEQ ID NO:6 representa la secuencia de CD59 de ratón de longitud completa, la isoforma A (véase, *p. ej.*, UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso 055186); SEQ ID NO:7 representa la secuencia de CD59 de ratón de longitud completa, la isoforma B (véase, *p. ej.*, UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P58019). En la secuencia de CD59 humana, los aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO:3 corresponden al péptido líder, los aminoácidos 26-102 de SEQ ID NO:3 corresponden a la proteína madura y los aminoácidos 103-128 de SEQ ID NO:3 se eliminan después de la traducción. El anclaje de GPI se une a CD59 en una asparagina en la posición 102 de SEQ ID NO:3. En la isoforma A de la secuencia de CD59 de ratón, los aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO:6 corresponden al péptido líder, los aminoácidos 24-96 de SEQ ID NO:6 corresponden a la proteína madura y los aminoácidos 97-123 de SEQ ID NO:6 se eliminan después de la traducción. El anclaje de GPI se une a CD59 en una serina en la posición 96 de SEQ ID NO:6. En la isoforma B de la secuencia de CD59 de ratón, los aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO:7 corresponden al péptido líder, los aminoácidos 24-104 de SEQ ID NO:7 corresponden a la proteína madura y los aminoácidos 105-129 de SEQ ID NO:7 se eliminan después de la traducción. El anclaje de GPI se une a CD59 en una asparagina en la posición 104 de SEQ ID NO:7. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que la CD59 o los fragmentos biológicamente activos de esta abarcan

todas las especies y variaciones de cepas.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" de CD59 humana se refiere a cualquier fragmento de CD59 humana que carezca de un anclaje de GPI y/o el aminoácido al cual se une (es decir, Asn-102), incluido cualquier fragmento de la proteína CD59 humana de longitud completa que tenga parte o toda la actividad inhibidora del complemento de la proteína CD59 de longitud completa; y la expresión fragmento "biológicamente activo" de CD59 de ratón se refiere a cualquier fragmento de la isoforma A o la isoforma B de CD59 de ratón que carezca de un anclaje de GPI y/o el aminoácido al que se une (es decir, Ser-96 de isoforma A o Asp-104 de isoforma B), incluido cualquier fragmento de cualquier isoforma de la proteína CD59 de ratón de longitud completa que tenga parte o toda la actividad inhibidora del complemento de la CD59 de longitud completa.

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) CD59; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende CD59 humana de longitud completa (SEQ ID NO:3). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de CD59 humana de longitud completa (SEQ ID NO:3). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de CD59 humana comprende el dominio extracelular de CD59 humana que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos 26-101 de SEQ ID NO:3). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende CD59 de ratón de longitud completa, la isoforma A (SEQ ID NO:6). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de CD59 de ratón, la isoforma A (SEQ ID NO:6). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de CD59 de ratón, la isoforma A, comprende el dominio extracelular de CD59 de ratón, la isoforma A, que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos 24-95 de SEQ ID NO:6). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende CD59 de ratón de longitud completa, la isoforma B (SEQ ID NO:7). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de CD59 de ratón, la isoforma B (SEQ ID NO:7). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de CD59 de ratón, la isoforma B, comprende el dominio extracelular de CD59 de ratón, la isoforma B, que carece de su anclaje de GPI (aminoácidos 24-103 de SEQ ID NO:7).

Gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Crry)

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1" o "Crry" se refiere a una glicoproteína de ratón unida a membrana que regula la activación del complemento, incluidos sus homólogos. La Crry regula la activación del complemento al servir como un cofactor para el factor del complemento I, una serina proteasa que escinde C3b y C4b depositados en el tejido hospedador. La Crry también actúa como un factor de aceleración del deterioro, evitando la formación de C4b2a y C3bBb, las convertasas de amplificación de la cascada del complemento.

SEQ ID NO:4 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína Crry de ratón de longitud completa. Los

aminoácidos 1-40 corresponden al péptido líder, los aminoácidos 41-483 de SEQ ID NO:4 corresponden a la proteína madura, que comprende los aminoácidos 41-405 de SEQ ID NO:4, correspondientes al dominio extracelular, los aminoácidos 406-426 de SEQ ID NO:4, correspondientes al dominio transmembrana y los aminoácidos 427-483 de SEQ ID NO:4, correspondientes al dominio citoplásmico. En el dominio extracelular, los aminoácidos 83-143 de SEQ ID NO:4 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 144-205 de SEQ ID NO:4 corresponden a SCR2, los aminoácidos 206-276 de SEQ ID NO:4 corresponden a SCR3, los aminoácidos 277-338 de SEQ ID NO:4 corresponden a SCR4 y los aminoácidos 339-400 de SEQ ID NO:4 corresponden a SCR5. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que la proteína Crry de ratón o los fragmentos biológicamente activos de esta abarcan todas las especies y variaciones de cepas. Tal como se utiliza en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" de proteína Crry de ratón se refiere a cualquier fragmento soluble de Crry de ratón que carezca del dominio transmembrana y el dominio citoplásmico, incluidos los fragmentos que comprendan, consistan esencialmente o consistan en 1, 2, 3, 4 o 5 dominios de SCR, incluido cualquier fragmento de la proteína Crry de ratón de longitud completa que tenga parte o toda la actividad inhibitoria del complemento de la proteína Crry de longitud completa.

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) Crry; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende la proteína Crry de ratón de longitud completa (SEQ ID NO:4). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de la proteína Crry de ratón (SEQ ID NO:4). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la proteína Crry de ratón se selecciona del grupo que consiste en SCR1-5 (aminoácidos 41-400 de SEQ ID NO:4) y el dominio extracelular de la proteína Crry de ratón (aminoácidos 41-405 de SEQ ID NO:4).

Receptor del complemento 1 (CR1)

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "receptor del complemento 1," "CR1" o "CD35" se refiere a un gen humano que codifica una proteína de 2039 aminoácidos, con un peso molecular previsto de 220 kilodaltons ("kD"), incluidos sus homólogos. El gen se expresa principalmente en eritrocitos, monocitos, neutrófilos y células B, pero también está presente en algunos linfocitos T, mastocitos y podocitos glomerulares. La proteína CR1 normalmente se expresa en entre 100 y 1000 copias por célula. El CR1 es el sistema principal para el procesamiento y la depuración de los complejos inmunes opsonizados por complemento. CR1 regula negativamente la cascada del complemento, media la adherencia inmunitaria y la fagocitosis, e inhibe las vías del complemento clásicas y alternativas. La proteína CR1 de longitud completa comprende un péptido señal de 42 aminoácidos, un dominio extracelular de 1930 aminoácidos, un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio citoplásmico de extremo C de 43 aminoácidos. El dominio extracelular de CR1 tiene 25 posibles secuencias señal de N-glicosilación y comprende 30 dominios de consenso cortos ("SCR"), también denominados repeticiones de proteína de control del complemento (CCP) o dominios sushi, cada uno con 60 a 70 aminoácidos de longitud. La homología de secuencia entre las SCR oscila entre 60-99 por ciento. Los 30 dominios de SCR se agrupan adicionalmente en cuatro regiones más largas denominadas repeticiones homólogas largas ("LHR"), donde cada una codifica segmentos de aproximadamente 45

kD de la proteína CR1, denominados LHR-A, -B, -C y -D. Las primeras tres comprenden siete dominios de SCR cada una, mientras que LHR-D comprende 9 dominios de SCR. Los sitios activos en el dominio extracelular de la proteína CR1 incluyen un sitio de unión a C4b con menor afinidad para C3b en las SCR 1-4 que comprende los aminoácidos 42-295, un sitio de unión a C3b con menor afinidad para C4b en las SCR 8-11 que comprende los aminoácidos 490-745, un sitio de unión a C3b con menor afinidad para C4b en las SCR 15-18 que comprende los aminoácidos 940-1196 y un sitio de unión a C1q en las SCR 22-28 que comprende los aminoácidos 1394-1842.

SEQ ID NO:9 representa la secuencia de aminoácidos de CR1 humana de longitud completa (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P17927). Los aminoácidos 1-41 corresponden al péptido señal, los aminoácidos 42-2039 corresponden a la proteína madura, que comprende los aminoácidos 42-1971, que corresponden al dominio extracelular, los aminoácidos 1972-1996 que corresponden al dominio transmembrana y los aminoácidos 1997-2039 que corresponden al dominio citoplásmico. En el dominio extracelular, los aminoácidos 42-101 corresponden a SCR 1, 102-163 corresponden a SCR2, los aminoácidos 164-234 corresponden a SCR3, los aminoácidos 236-295 corresponden a SCR4, los aminoácidos 295-355 corresponden a SCR5, los aminoácidos 356-418 corresponden a SCR6, los aminoácidos 419-489 corresponden a SCR7, los aminoácidos 491-551 corresponden a SCR8, los aminoácidos 552-613 corresponden a SCR9, los aminoácidos 614-684 corresponden a SCR10, los aminoácidos 686-745 corresponden a SCR11, los aminoácidos 745-805 corresponden a SCR12, los aminoácidos 806-868 corresponden a SCR13, los aminoácidos 869-939 corresponden a SCR14, los aminoácidos 941-1001 corresponden a SCR15, los aminoácidos 1002-1063 corresponden a SCR16, los aminoácidos 1064-1134 corresponden a SCR17, los aminoácidos 1136-1195 corresponden a SCR18, los aminoácidos 1195-1255 corresponden a SCR 19, los aminoácidos 1256-1318 corresponden a SCR 20, los aminoácidos 1319-1389 corresponden a SCR 21, los aminoácidos 1394-1454 corresponden a SCR 22, los aminoácidos 1455-1516 corresponden a SCR 23, los aminoácidos 1517-1587 corresponden a SCR 24, los aminoácidos 1589-1648 corresponden a SCR 25, los aminoácidos 1648-1708 corresponden a SCR 26, los aminoácidos 1709-1771 corresponden a SCR 27, los aminoácidos 1772-1842 corresponden a SCR 28, los aminoácidos 1846-1906 corresponden a SCR 29, los aminoácidos 1907-1967 corresponden a SCR 30. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que la proteína CR1 o los fragmentos biológicamente activos de esta abarcan todas las especies y variaciones de cepas. Tal como se usa en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" de la proteína CR1 se refiere a cualquier fragmento soluble de CR1 que carece del dominio transmembrana y el dominio citoplásmico, incluidos fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 dominios de SCR, incluido cualquier fragmento de la proteína CR1 de longitud completa que tenga parte o toda la actividad inhibitora del complemento de la proteína CR1 de longitud completa.

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) CR1; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende la proteína CR1 humana de longitud completa (SEQ ID NO:9). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo de la proteína CR1 humana (SEQ ID NO:9). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo de la proteína CR1

humana se selecciona del grupo que consiste en SCR1-3 (aminoácidos 42-234 de SEQ ID NO:9), SCR1-4 (aminoácidos 42-295 de SEQ ID NO:9), SCR1-10 (aminoácidos 42-684 de SEQ ID NO:9), SCR8-10 (aminoácidos 491-684 de SEQ ID NO:9), SCR 8-11 (aminoácidos 491-745 de SEQ ID NO:9), SCR15-17 (aminoácidos 941-1134 de SEQ ID NO:9), SCR15-18 (aminoácidos 941-1195 de SEQ ID NO:9) y SCR22-28 (aminoácidos 1394-1842 de SEQ ID NO:9).

Factor H (FH)

Tal como se usa en la presente, la expresión "factor H del complemento", "factor H" o "FH" se refiere al factor H del complemento, una glicoproteína de plasma de cadena de polipéptidos única, que incluye homólogos de esta. La proteína está compuesta por 20 dominios de repetición de consenso cortos (SCR) conservados de aproximadamente 60 aminoácidos, dispuestos de forma continua como un collar de perlas, separados por secuencias enlazadoras cortas de 2-6 aminoácidos cada una. El factor H se une a C3b, acelera el deterioro de la vía alternativa C3-convertasa (C3bBb) y actúa como un cofactor para la inactivación proteolítica de C3b. En presencia del factor H, la proteólisis por el factor I produce la escisión y la inactivación de C3b. El factor H tiene al menos tres dominios de unión distintos para C3b, que se ubican dentro de SCR 1-4, SCR 5-8 y SCR 19-20. Cada sitio del factor H se une a una región distinta dentro de la proteína C3b: los sitios de extremo N se unen a C3b nativa; el segundo sitio, ubicado en la región media del factor H, se une al fragmento C3c y el sitio ubicado dentro de SCR19 y 20 se une a la región de C3d. Además, el factor H también contiene sitios de unión para la heparina, que se ubican dentro de SCR 7, SCR 5-12 y SCR 20 del factor H y se superponen con los de los sitios de unión a C3b. Los análisis estructurales y funcionales han demostrado que los dominios para la actividad inhibitoria del complemento del factor H se ubican dentro de los cuatro primeros dominios de SCR de extremo N.

SEQ ID NO:5 representa la secuencia de aminoácidos del factor H humano de longitud completa (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P08603); SEQ ID NO:8 representa la secuencia de aminoácidos del factor H de ratón de longitud completa (véase, p. ej., UniProtKB/Swiss-Prot. n.º de acceso P06909). En la secuencia del factor H humano, los aminoácidos 1-18 de SEQ ID NO:5 corresponden al péptido señal y los aminoácidos 19-1231 de SEQ ID NO:5 corresponden a la proteína madura. Dentro de esa proteína, los aminoácidos 21-80 de SEQ ID NO:5 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 85-141 de SEQ ID NO:5 corresponden a SCR 2, los aminoácidos 146-205 de SEQ ID NO:5 corresponden a SCR 3, los aminoácidos 210-262 de SEQ ID NO:5 corresponden a SCR 4 y los aminoácidos 267-320 de SEQ ID NO:5 corresponden a SCR 5. En la secuencia del factor H de ratón, los aminoácidos 1-18 de SEQ ID NO:8 corresponden al péptido señal y los aminoácidos 19-1234 de SEQ ID NO:8 corresponden a la proteína madura. Dentro de esa proteína, los aminoácidos 19-82 de SEQ ID NO:8 corresponden a SCR 1, los aminoácidos 83-143 de SEQ ID NO:8 corresponden a SCR 2, los aminoácidos 144-207 de SEQ ID NO:8 corresponden a SCR 3, los aminoácidos 208-264 de SEQ ID NO:8 corresponden a SCR 4 y los aminoácidos 265-322 de SEQ ID NO:8 corresponden a SCR 5. Se entiende que existen especies y variaciones de cepas para los péptidos, polipéptidos y proteínas descritos, y que el factor H o los fragmentos biológicamente activos de este abarcan todas las especies y variaciones de cepas.

Tal como se usa en la presente, la expresión fragmento "biológicamente activo" del factor H se refiere a cualquier parte de una proteína del factor H que tenga parte o toda la actividad inhibitoria del complemento de la proteína del factor H de longitud completa, e incluye, entre otros, fragmentos del factor H que comprenden SCR 1-4, SCR 1-5, SCR 1-8, SCR 1-18, SCR 19-20 o cualquier homólogo de un factor H de origen natural o un fragmento de este, tal como se describe detalladamente abajo. En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del factor H tiene una o más de las siguientes propiedades: (1) unión a proteína C reactiva (CRP), (2) unión a C3b, (3) unión a heparina, (4) unión a ácido siálico, (5) unión a superficies celulares endoteliales, (6) unión a receptor de integrina celular, (7) unión a patógenos, (8) actividad del cofactor de C3b, (9) actividad de deterioro-aceleración de C3b y (10) inhibición de la vía del complemento alternativa.

En un aspecto, se proporciona una composición soluble tal como se define en las reivindicaciones que comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) FH; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la

construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende el factor H de longitud completa humano (SEQ ID NO:5) o de ratón (SEQ ID NO:8). En determinadas realizaciones, la parte del inhibidor del complemento de la construcción comprende un fragmento biológicamente activo del factor H humano (SEQ ID NO:5) o de ratón (SEQ ID NO:8). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del factor H humano (SEQ ID NO:5) se selecciona del grupo que consiste en SCR 1-4 (aminoácidos 21-262 de SEQ ID NO:5), SCR 1-5 del factor H (aminoácidos 21-320 de SEQ ID NO:5), SCR 1-8 del factor H (aminoácidos 21-507 de SEQ ID NO:5) y SCR 1-18 del factor H (aminoácidos 21-1104 de SEQ ID NO:5). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del factor H de ratón (SEQ ID NO:8) se selecciona del grupo que consiste en SCR 1-4 (aminoácidos 19-264 de SEQ ID NO:8), SCR 1-5 del factor H (aminoácidos 19-322 de SEQ ID NO:8), SCR 1-8 del factor H (aminoácidos 19-507 de SEQ ID NO:8) y SCR 1-18 del factor H (aminoácidos 19-1109 de SEQ ID NO:8). En determinadas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del factor H humano (SEQ ID NO:5) o de ratón (SEQ ID NO:8) comprende (y en determinadas realizaciones consiste en o consiste esencialmente en) al menos los primeros cuatro dominios de SCR de extremo N del factor H, incluidos, por ejemplo, al menos cualquiera de los primeros 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más dominios de SCR de extremo N del factor H.

Proteínas del activador del complemento

Se proporcionan en la presente composiciones solubles tal como se definen en las reivindicaciones que comprenden una construcción, en donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del activador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. También se ha identificado una cantidad de proteínas endógenas solubles que activan el complemento. Estos activadores del complemento incluyen, entre otros, diversas proteínas de inmunoglobulina (Ig), incluidas el isotipo de Ig humana G₁(IgG₁), el isotipo de Ig humana M (IgM), el isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃) y Fc de IgM de ratón, así como el factor de veneno de cobra (CVF) y fragmentos biológicamente activos de estos. La actividad activadora del complemento de las proteínas de Ig se ha localizado al dominio Fc. Por lo tanto, los fragmentos biológicamente activos de las proteínas de Ig humanas y de ratón activadoras del complemento incluyen el dominio Fc, tal como el dominio Fc de IgG₁ humana, el dominio Fc de IgM humana, el dominio Fc de IgG₃ de ratón y el dominio Fc de IgM de ratón.

Proteínas de inmunoglobulina

Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a glicoproteínas de la superfamilia de proteínas de inmunoglobulina (Ig). Una molécula de anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) es tetramérica, comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos. Las dos cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Cada molécula de Ig de longitud completa contiene al menos dos sitios de unión para una diana o antígeno específico.

El sistema inmunitario produce varias clases diferentes de moléculas de Ig (isotipos), que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uno distinguido por la clase particular de polipéptido de cadena pesada presente: alfa (α) que se encuentra en IgA, delta (δ) que se encuentra en IgD, épsilon (ε) que se encuentra en IgE, gamma (γ) que se encuentra en IgG y mu (μ) que se encuentra en IgM. Existen al menos cinco polipéptidos de cadena pesada y diferentes (isotipos) que se encuentran en IgG. En cambio, existen solo isotipos de polipéptidos de cadena ligera, que se denominan cadenas kappa (κ) y lambda (λ). Las características distintivas de los isotipos de anticuerpos se definen por las secuencias de los dominios constantes de la cadena pesada.

Una molécula de IgG comprende dos cadenas ligeras (de forma κ o λ) y dos cadenas pesadas (de forma γ) unidas por enlaces disulfuro. Las formas κ y λ de la cadena ligera de IgG contienen un dominio de secuencias de aminoácidos relativamente variable, denominado la región variable (denominado de diversas maneras una "región V_L", "V_κ" o "V_λ") y un dominio de secuencias de aminoácidos relativamente conservadas, denominado la región constante (región C_L). De modo similar, cada cadena pesada de IgG contiene una región variable (región V_H) y una o más regiones conservadas: una cadena pesada de IgG completa contiene tres dominios constantes ("regiones C_{H1}", "C_{H2}" y "C_{H3}")

y una región bisagra. Dentro de cada región V_L o V_H , las regiones hipervariables, también conocidas como regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), se intercalan entre las regiones marco relativamente conservadas ("FR"). En general, la región variable de un polipéptido de cadena ligera o pesada contiene cuatro FR y tres CDR dispuestas en el siguiente orden a lo largo del polipéptido: NH_2 -FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-COOH.

5 Juntas la CDR y la FR determinan la estructura tridimensional del sitio de unión a IgG y, por lo tanto, la proteína o antígeno diana específico a la cual se une esa molécula de IgG. Cada molécula de IgG es dimerica y es capaz de unirse a dos moléculas de antígeno. La escisión de una IgG dimerica con la papaína de proteasa produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos ("Fab") y un fragmento "Fc" o dominio Fc, que se denomina así porque se cristaliza fácilmente.

10

En algunas realizaciones, la composición tal como se define en las reivindicaciones comprende una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del activador del complemento
 15 seleccionada del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G_1 (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G_3 (IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón y dominio Fc de IgM de ratón y donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los
 20 dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de
 25 CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo
 30 ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la
 35 unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al
 40 segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En determinadas realizaciones, la parte del activador del complemento de la construcción comprende una proteína de Ig o un fragmento biológicamente activo de esta. En determinadas realizaciones, la proteína de Ig o el fragmento biológicamente activo de esta comprende IgG₁ humana, dominio Fc de IgG₁ humana, IgM humana, dominio Fc de IgM humana, IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgG₃ de ratón,
 45 IgM de ratón y dominio Fc de IgM de ratón.

Factor de veneno de cobra (CVF)

Tal como se usa en la presente, las expresiones "factor de veneno de cobra", "CVF" y "C3b (Cobra)" se refieren al
 50 componente activador del complemento no tóxico de veneno de cobra. Al igual que la C3b humana de origen natural, CVF (SEQ ID NO:13) forma un complejo, o convertasa, con los componentes del complemento factor B y factor D. Esta CVFBbD convertasa es capaz de activar C3 en una amplia gama de especies a través de la vía del complemento alternativa. La CVFBbD convertasa es resistente al Factor H y por lo tanto no se bloquea a través de la actividad del Factor I o CR1 y puede convertir casi el 100 % de C3 a los fragmentos C3 y C5. Los niveles de iC3b, C3a, SC5b-9,
 55 C5a y el producto de escisión del Factor B Bb son todos extremadamente altos en los sueros tratados con CVF. La clonación y el secuenciamiento de CVF de la cobra de monóculo (*Naja kaouthia*) se informó en Fritzinger y col., "Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor", Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA 91(26):12775-779 (1994); la secuencia se depositó en la base de datos de GenBank con el número de acceso U09969. Los términos "factor de veneno de cobra", "CVF" y "C3b (Cobra)" también se refieren a moléculas de CVF híbridas que comprenden
 60 una parte de CVF y una parte del componente 3 del complemento (C3), tal como las que se describen en Fritzinger y col., "Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion," Develop. Comp. Immunol. 33(1):105-116 (2009). Estos híbridos comprenden proteínas en las cuales los 113 o 315 residuos de extremo C de C3 se reemplazaron con secuencias de CVF correspondientes. Ambos híbridos formaron convertasas estables que presentaron actividad de escisión de C3, aunque en tasas diferentes. Ninguna
 65 convertasa escindió C5. Ambas convertasas mostraron resistencia parcial a la inactivación por los factores H y I, lo que les permite agotar el complemento en el suero humano.

En un aspecto, la composición comprende una construcción tal como se define en las reivindicaciones, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) CVF. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 seleccionados del grupo que consiste en C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y también se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a IFN α . Tal como se usa en la presente, "se une selectivamente" significa que una construcción presenta unión mejorada a un ligando y/o unión disminuida a un ligando diferente. Por ejemplo, "se une selectivamente" puede significar: 1) que una construcción que se ha alterado tiene una afinidad de unión por un primer ligando que es similar a la afinidad de unión de la construcción no alterada por el primer ligando, mientras que la construcción que se ha alterado tiene una afinidad inferior por un segundo ligando que la construcción no alterada y, por lo tanto, la construcción alterada "une selectivamente" el primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; 2) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando mientras conserva la unión a un segundo ligando que es similar a la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción se "une selectivamente" al primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos; o 3) que una construcción que se ha alterado tiene aumento de unión a un primer ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al primer ligando y también tiene una afinidad de unión inferior para un segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada al segundo ligando y, por lo tanto, la construcción alterada se "une selectivamente" al primer ligando y no al segundo ligando en comparación con la unión de la construcción no alterada a los dos ligandos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión.

30

Composiciones de la invención

Residuos de aminoácidos en CR2 que participan en la unión selectiva a ligandos particulares

Los análisis estructurales de la unión de CR2 a EBV gp350, IFN α y C3d descritos en la presente (véase el ejemplo 1) identificaron una cantidad de residuos de aminoácidos de CR2 que son importantes para la unión de cada uno de estos ligandos. Aunque algunos de estos residuos de aminoácidos son importantes para la unión de los tres ligandos, otros son importantes para la unión de un ligando específico (p. ej., EBV gp350, IFN α o C3d).

Por ejemplo, los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-EBV gp350 son N11, R13, A22, R28, S32, R36, K41, K57, Y64, K67, Y68, R83, G84 y R89 (véase la tabla 2). Los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-EBV gp350, pero no la interacción de unión CR2-C3d o CR2-IFN α , son N11, R36, K41, Y64 y K67 (véase la tabla 2). Los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-IFN α son R13, Y16, R28, S42, K48, K50, Y68, R83, G84 y R89 (véase la tabla 2). Los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-IFN α , pero no la interacción de unión CR2-C3d o CR2-EBV gp350, son S42 y K50 (véase la tabla 2). Los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-C3d son I9, R13, Y16, A22, R28, Y29, C31, S32, G33, T34, K48, D56, K57, Y68, S70, R83, G84, R89, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 (véase la tabla 2). Los residuos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-C3d, pero no la interacción de unión de CR2-gp350 o CR2-IFN α son I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 (véase la tabla 2). Los residuos de aminoácidos que se ha determinado que son importantes para la interacción de unión de CR2-C3d, probablemente sean importantes para la interacción de unión de CR2 con otros fragmentos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3dg e iC3b. Los residuos que se ha determinado que son importantes para las interacciones de unión de CR2-gp350, CR2-IFN α y CR2-C3d son R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. Como estos residuos de aminoácidos son importantes para las interacciones de unión entre CR2 y más de uno de sus ligandos, la mutación de los residuos de aminoácidos en una o más de estas posiciones también puede mejorar la capacidad de direccionamiento de la parte de CR2 para C3d y/u otros ligandos de CR2.

Los grupos dirigidos mejorados descritos en la presente, que comprenden al menos una o más mutaciones en los diversos residuos de aminoácidos importantes para las interacciones de unión entre CR2 y EBV-gp350, CR2 y IFN α , y/o CR2 y C3d, se pueden utilizar para administrar un modulador del complemento (p. ej., un inhibidor del complemento o un activador del complemento) a cualquier sitio fisiológico (p. ej., un sitio de inflamación) adecuado para el uso de los grupos dirigidos a CR2 descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0267980 A1, la publicación de patente estadounidense n.º US 2008/0221011 A1 y la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0260198 A1.

La mutación de los residuos de aminoácidos de CR2 que se ha determinado que es importante para una interacción de unión entre CR2 y un ligando específico probablemente disminuya la afinidad de unión de CR2 para ese ligando específico, mientras que deja la afinidad de unión de CR2 para sus otros ligandos relativamente no afectada. Por ejemplo, la mutación de al menos uno de los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67 en CR2 (SEQ ID NO:1) probablemente reduzca la afinidad de unión de CR2 para EBV gp350, mientras que no cambia su afinidad de unión para C3d y IFN α . De modo similar, la mutación de al menos uno de los residuos de aminoácidos S42 y K50 probablemente reduzca la afinidad de unión de CR2 para IFN α mientras que no cambia su afinidad de unión para C3d y gp350. La mutación de al menos uno de los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 probablemente reduzca la afinidad de unión de CR2 para C3d mientras que no cambia su afinidad de unión para IFN α y gp350.

Se proporcionan en la presente composiciones solubles que comprenden una construcción tal como se define en las reivindicaciones, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α o EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la construcción no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3.

De acuerdo con la invención, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos adicional en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras.

De acuerdo con la invención, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos adicional en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos adicionales en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para EBV gp350. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras.

En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50 y la parte de CR2 tienen afinidad de unión disminuida para IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50 y la parte de CR2

tienen afinidad de unión disminuida para IFN α . En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una o dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una o dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras.

5 En determinadas realizaciones, la parte de CR2 comprende un polipéptido que contiene algunos o todos los sitios de unión a ligandos de la proteína CR2 e incluye, entre otros, proteínas CR2 de longitud completa (tal como CR2 humana como se muestra en SEQ ID NO:1), proteínas CR2 solubles (tal como un fragmento de CR2 que comprende el dominio extracelular de CR2) y otros fragmentos biológicamente activos de CR2, tal como un fragmento de CR2 que comprende SCR1-2 (SEQ ID NO:2), o cualquier homólogo de una CR2 de origen natural o fragmento de esta, como
10 se describe detalladamente abajo. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 tiene una o más de las siguientes propiedades de CR2: (1) la capacidad de unirse selectivamente al fragmento proteolítico C3d de C3, (2) la capacidad de unirse selectivamente al fragmento proteolítico iC3b de C3, (3) la capacidad de unirse selectivamente al fragmento proteolítico C3dg de C3, (4) la capacidad de unirse selectivamente a uno o más fragmentos unidos a células del fragmento proteolítico C3b de C3 que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2, y (5) la capacidad
15 de unirse selectivamente a IFN α .

En determinadas realizaciones, la parte de CR2 comprende los dos primeros dominios de SCR de extremo N de CR2 (aminoácidos de 23 a 146 de SEQ ID NO:1). En determinadas realizaciones, la parte de CR2 comprende los tres primeros dominios de SCR de extremo N de CR2 (aminoácidos de 23 a 212 de SEQ ID NO:1). En determinadas
20 realizaciones, la parte de CR2 comprende los cuatro primeros dominios de SCR de extremo N de CR2 (aminoácidos de 23 a 271 de SEQ ID NO:1). En determinadas realizaciones, la parte de CR2 comprende (y en algunas realizaciones consiste o consiste esencialmente en) al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de CR2, incluidos, por ejemplo, al menos cualquiera de los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 primeros dominios de SCR de CR2.

25 En determinadas realizaciones, la parte de CR2 de las construcciones descritas en la presente comprende (y en algunas realizaciones consiste o consiste esencialmente en) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más sustituciones de aminoácidos adicionales. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos pueden ser una mezcla de
30 sustituciones conservadoras y no conservadoras.

Composiciones para la administración dirigida de moduladores del complemento en áreas de activación del sistema del complemento

35 En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de
40 CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350. La parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos adicional en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11,
45 R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos adicionales en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11,
50 R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cuatro sustituciones de aminoácidos adicionales en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones en aminoácidos del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A y K67A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: C3d, iC3b, C3dg, uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2, CD23 y IFN α . En
60 algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350. En algunas realizaciones, la al menos una sustitución de aminoácidos disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones,
65 la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras

realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

5

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de
 10 CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S42 y K50 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene
 15 al menos dos sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, IFN α . En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una o dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una o dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones en aminoácidos del grupo que consiste en: S42A y K50A. En determinadas
 20 realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: C3d, iC3b, C3dg, uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y CD23. En algunas realizaciones, la construcción no se une a IFN α . En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a IFN α . En algunas realizaciones, la al menos una sustitución de aminoácidos disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2
 25 para IFN α en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del
 30 complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

35 En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del
 40 modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50; además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida
 45 para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50, además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que
 50 aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50, además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que
 55 aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50, además contiene cinco sustituciones de aminoácidos adicionales en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En cualquiera de las realizaciones
 60 anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones en un aminoácido del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A y K67A y una mutación del grupo que consiste en S42A y K50A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une
 65 selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: C3d, iC3b, C3dg, uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y CD23. En algunas realizaciones, la

construcción no se une a IFN α y EBV gp350. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a IFN α y EBV gp350. En algunas realizaciones, las al menos dos sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para IFN α y EBV gp350 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene cinco sustituciones de aminoácidos adicionales en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, EBV gp350 y IFN α . En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones en un aminoácido del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A y K67A y mutaciones S42A y K50A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: C3d, iC3b, C3dg, uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2 y CD23. En algunas realizaciones, la construcción no se une a IFN α y EBV gp350. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a IFN α y EBV gp350. En algunas realizaciones, las al menos tres sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para IFN α y EBV gp350 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

55 **Composiciones para la administración dirigida de moduladores del complemento en sitios de infección por el virus de Epstein Barr**

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de infección por el virus de Epstein Barr que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une

a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23, EBV gp350 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la al menos una sustitución de aminoácidos disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de infección por virus de Epstein Barr que

fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: S42 y K50, además contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más

5 fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En determinadas realizaciones, la parte de

10 CR2 contiene una sustitución de un aminoácido del grupo que consiste en S42A y K50A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a CD23. En algunas realizaciones, la construcción no se une a IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos dos sustituciones de aminoácidos disminuyen

15 la afinidad de unión de la parte de CR2 para IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF,

20 CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃ (IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

25 En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de

30 CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del

35 grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

40 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

45 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

50 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

55 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

60 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

65 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo

que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo

5 que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

10 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

15 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

20 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos S42 y K50, además contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

25 tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α . En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores,

30 al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene sustituciones de aminoácidos S42A y K50A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a CD23. En algunas realizaciones, la construcción no se une a IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3.

35 En algunas realizaciones, las al menos tres sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas

40 realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Cry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G $_1$ (IgG $_1$), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G $_3$ (IgG $_3$), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG $_1$ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG $_3$ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

45 ***Composiciones para la administración dirigida de moduladores del complemento en sitios de producción de interferón alfa***

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la

50 administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de producción de IFN α que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del

55 complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64; además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos

60 proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la

65 parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en los residuos de

aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos cuatro

5 sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56,

10 S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64; además contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64, además contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones de aminoácidos del grupo que consiste en: N11A y Y64A. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos dos sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350

60 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos dos sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en

65

cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que
 5 consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

10

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de producción de IFN α que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al
 15 menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos una sustitución de
 20 aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado
 25 del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31,
 30 G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100,
 35 N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de
 40 unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93,
 65

A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos tres sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones de aminoácidos del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A y K67A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos tres sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de producción de IFN α que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos

en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos cuatro sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos cuatro sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones en aminoácidos del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A, y K67A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos cuatro sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En otras realizaciones, algunos de estos inhibidores del complemento se seleccionan del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas

de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

5 En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de producción de IFN α que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del
10 complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70,
15 H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109
20 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de
25 unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de
30 unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En
35 determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene
40 al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en
45 residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del
50 grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41,
55 Y64 y K67; además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos once
60 sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos
65 seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV

gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67; además contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos cinco sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones de aminoácidos del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A, y K67A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos cinco sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃ (IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

En algunos aspectos, se proporciona una composición soluble como se define en las reivindicaciones capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de producción de IFN α que comprenden una construcción, donde la construcción comprende: (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; donde la parte de CR2 contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos que disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o

tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos once sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos doce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos trece sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene al menos catorce sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 contiene cinco sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos N11, R36, K41, Y64 y K67, además contiene quince sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene afinidad de unión disminuida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos seis sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos seis sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras. En ciertas realizaciones, la parte de CR2 contiene una o más sustituciones de aminoácidos del grupo que consiste en: N11A, R36A, K41A, Y64A, y K67A. En determinadas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la parte de CR2 se une selectivamente a una o más proteínas del grupo que consiste en: CD23 y IFN α . En algunas realizaciones, la construcción no se une a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En otras realizaciones, la construcción tiene afinidad de unión disminuida a EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, las al menos seis sustituciones de aminoácidos disminuyen la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3 en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes. En algunas realizaciones, la parte del modulador del complemento es un inhibidor del complemento. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En otras realizaciones, la parte del modulador del complemento es un activador del complemento. En algunas de estas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF.

60 **Otras sustituciones de CR2 para la administración dirigida de moduladores del complemento**

En cualquiera de las realizaciones de cualquiera de las composiciones como se definen en las reivindicaciones, la parte de CR2 puede contener además al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once sustituciones de aminoácidos adicionales en otras posiciones en la parte de CR2. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además

contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras.

Proteínas enlazadoras

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, la construcción que comprende una parte de CR2 o un fragmento biológicamente activo de esta y una parte inhibidora del complemento que comprende CD59 humana, isoforma A de CD59 de ratón, isoforma B de CD59 de ratón, proteína Crry de ratón, factor H humano, factor H de ratón, CR1 humano, MCP humana, DAF humano o DAF de ratón o un fragmento biológicamente activo de estos también incluye una secuencia enlazadora de aminoácidos que enlaza la parte de CR2 y la parte inhibidora del complemento (p. ej., CD59 humana, isoforma A de CD59 de ratón, isoforma B de CD59 de ratón, proteína Crry de ratón, factor H humano, factor H de ratón, CR1 humano, MCP humana, DAF humano o DAF de ratón o un fragmento biológicamente activo de estos).

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, la construcción que comprende una parte de CR2 o un fragmento biológicamente activo de este y una parte activadora del complemento que comprende IgG₁ humana, IgM humana, IgG₃ de ratón, IgM de ratón o CVF o un fragmento biológicamente activo de estos también incluye una secuencia enlazadora de aminoácidos que enlaza la parte de CR2 y la parte activadora del complemento (p. ej., IgG₁ humana, IgM humana, IgG₃ de ratón, IgM de ratón o CVF o un fragmento biológicamente activo de estos).

Los ejemplos de secuencias enlazadoras son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, (Gly₄Ser), (Gly₄Ser)₂, (Gly₄Ser)₃, (Gly₃Ser)₄, (SerGly₄), (SerGly₄)₂, (SerGly₄)₃ y (SerGly₄)₄. Las secuencias encontradas también pueden comprender secuencias encontradas "naturales" encontradas entre dominios diferentes de factores del complemento. Por ejemplo, se puede utilizar VSVFPLE (SEQ ID NO:26) o EYFNKYSS (SEQ ID NO:27), la secuencia enlazadora entre los dos primeros dominios de repetición de consenso cortos de extremo N de CR2 humano. En algunas realizaciones, se utiliza la secuencia enlazadora entre el cuarto y el quinto dominio de repetición de consenso corto de extremo N de CR2 humano (EEIF) (SEQ ID NO:28). En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora comprende al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos números.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, en la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las construcciones y/o proteínas de fusión como se define en las reivindicaciones. Las composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las construcciones y/o proteínas de fusión descritas en la presente, generalmente, son formuladas como soluciones farmacéuticas estériles sustancialmente isotónicas en cumplimiento absoluto con todas las regulaciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) de la Administración de medicamentos y alimentos de estadounidense. En determinadas realizaciones, la composición es libre de patógeno. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones líquidas, por ejemplo, en amortiguadores fisiológicamente compatibles tal como solución salina balanceada de Hank, tampón fosfato salino o solución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden estar en forma sólida y pueden volver a disolverse o volver a suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se contemplan composiciones liofilizadas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes

aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite fraccionado, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea adecuado.

En determinadas realizaciones, las composiciones se formulan de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la inyección. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se formulan para inyección intravenosa, intraperitoneal o intraocular. Normalmente, las composiciones para inyección son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaina para calmar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran separados o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administrará por infusión, se puede dosificar con un frasco de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además ingredientes adicionales, por ejemplo, conservantes, amortiguadores, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes clarificantes o humectantes no iónicos, agentes de aumento de la viscosidad y similares.

Los conservantes adecuados para su uso en una solución incluyen policuaternio-1, cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, EDTA disódico, ácido sórbico, cloruro de bencetonio y similares. Normalmente (pero no necesariamente), dichos conservantes se emplean a un nivel de entre 0,001 % y 1,0 % en peso.

Los amortiguadores adecuados incluyen ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, bifosfato de sodio y similares, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8 y, preferentemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7,5.

Los agentes de tonicidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, cloruro de sodio y similares, de tal manera que el equivalente de cloruro de sodio de la solución inyectable se encuentra en el intervalo de 0,9 más o menos 0,2 %.

Los antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, tiourea y similares. Los agentes clarificantes y humectantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes de aumento de la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, petrolato, polietilenglicol, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para una variedad de modos de administración descritos en la presente, incluida, por ejemplo, la administración sistémica o localizada. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones inyectables o en una forma adecuada para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden envasar en dosificaciones unitarias simples o en formas de varias dosificaciones. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración a un individuo, un vertebrado, un mamífero o un ser humano a través de cualquier vía de administración descrita en la presente, incluida la administración oral o la inyección intravenosa.

Procedimientos de la invención

Procedimientos para realizar una construcción dirigida para la modulación del sistema del complemento

En la presente se proporcionan procedimientos para realizar una construcción como se define en las reivindicaciones que se une selectivamente a uno o más ligandos de CR2, donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción, y donde la construcción comprende (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento. En determinadas realizaciones,

la construcción es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α o EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la construcción se une selectivamente a EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α y uno o más fragmentos proteolíticos de C3.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 pero no se une selectivamente a EBV gp350, donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción en una posición seleccionada del grupo que consiste en: N11 y Y64 de SEQ ID NO:2, donde la construcción comprende (i) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (ii) una parte del modulador del complemento. En algunas realizaciones, la o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción son mutaciones al aminoácido alanina. En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción en una posición seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89 de SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

También se describe un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350 pero no se une selectivamente a IFN α , donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción del grupo que consiste en: S42 y K50, donde la construcción comprende (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento. La o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción pueden ser mutaciones al aminoácido alanina. El procedimiento puede comprender además mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. El procedimiento puede comprender mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α pero no se une selectivamente a EBV gp350, donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: N11 y Y64 de SEQ ID NO:2, donde la construcción comprende (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento. En algunas realizaciones, la o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción son mutaciones al aminoácido alanina. En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a IFN α pero no se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, donde el procedimiento comprende (a) mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción del grupo que consiste en: N11 y Y64; y (b) mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128, donde la construcción comprende (i) una parte de receptor del complemento 2 (CR2) que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (ii) una parte de modulador del complemento. En algunas realizaciones, la o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción son mutaciones al aminoácido alanina. En algunas realizaciones, el procedimiento además comprende mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

También se describe un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a EBV gp350 y IFN α , pero no se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo

que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128, donde la construcción comprende (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (b) una parte del modulador del complemento. La o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción pueden ser mutaciones al aminoácido alanina. El procedimiento puede comprender además mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. El procedimiento puede comprender mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

La descripción además proporciona un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a EBV gp350 pero no se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y IFN α , donde el procedimiento comprende (a) mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción del grupo que consiste en: S42 y K50; y (b) mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128, donde la construcción comprende (i) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) que comprende una proteína CR2 de SEQ ID NO:1 o un fragmento biológicamente activo de esta, donde la parte de CR2 contiene al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2; y (ii) una parte de modulador del complemento. La o las mutaciones en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción pueden ser mutaciones al aminoácido alanina. El procedimiento puede comprender además mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. El procedimiento puede comprender mutar cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción.

Procedimientos para reducir la afinidad de unión o alterar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para uno o más ligandos

En otro aspecto, en la presente se proporcionan procedimientos para reducir la afinidad de unión de una construcción para EBV-gp350, donde la construcción comprende (a) una parte de CR2 que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR de extremo N del CR2; y (b) una parte del modulador del complemento; el procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido de la parte de CR2 seleccionado del grupo que consiste en N11 y Y64 de SEQ ID NO:2.

En determinados aspectos, se proporciona un procedimiento para reducir la afinidad de unión de la parte de CR2 de cualquiera de las construcciones descritas en la presente para EBV gp350 y IFN α , donde el procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido en la parte de CR2 seleccionado del grupo que consiste en: N11 y Y64. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos dos residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos tres residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos cuatro residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos cinco residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos seis residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos siete residuos de aminoácidos en la parte de CR2 seleccionados del grupo que consiste en: N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, las al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete mutaciones son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En determinadas realizaciones, las al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete mutaciones son sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de la construcción para EBV gp350 y/o IFN α se reduce en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes.

En determinados aspectos, se proporciona un procedimiento para reducir la afinidad de unión de la parte de CR2 de cualquiera de las construcciones descritas en la presente para EBV gp350, donde el procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N11 y Y64. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos dos residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N11, R36, K41, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos tres residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N11, R36, K41, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos cuatro residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N11, R36, K41, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar al menos cinco residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N11, R36, K41, Y64 y K67. En determinadas realizaciones, las al menos una, dos, tres, cuatro o cinco mutaciones pueden ser sustituciones de

aminoácidos conservadoras. En determinadas realizaciones, las al menos una, dos, tres, cuatro o cinco mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de la construcción para EBV gp350 se reduce en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes.

En determinados aspectos, se proporciona un procedimiento para reducir la afinidad de unión de la parte de CR2 de cualquiera de las construcciones descritas en la presente para IFN α , donde el procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S42 y K50. En determinadas realizaciones, el procedimiento comprende mutar dos residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en S42 y K50. En determinadas realizaciones, las al menos una o dos mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. En determinadas realizaciones, las al menos una o dos mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunas realizaciones, la afinidad de unión de la construcción para IFN α se reduce en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes.

En otro aspecto, el procedimiento para reducir la afinidad de unión de la parte de CR2 de cualquiera de las construcciones descritas en la presente para uno o más ligandos de CR2 además comprende mutar al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, u once residuos de aminoácidos en otras posiciones en la parte de CR2. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos cinco sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos seis sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos siete sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos ocho sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos nueve sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene al menos diez sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En determinadas realizaciones, la parte de CR2 opcionalmente además contiene once sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, K48, K57, Y68, R83, G84 y R89. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservadoras. En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservadoras.

También se describen en la presente procedimientos para alterar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para C3, C3(H₂O) o los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, con respecto a otros ligandos de CR2 (p. ej., EBV gp350 e IFN α). La alteración puede mejorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos un residuo de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción seleccionada del grupo que consiste en N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. La alteración puede mejorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos dos residuos de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción seleccionada del grupo que consiste en N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. La alteración puede mejorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos tres residuos de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción seleccionada del grupo que consiste en N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. La alteración puede mejorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos cuatro residuos de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción seleccionada del grupo que consiste en N11, R36, K41, S42, K50, Y64 y K67. La alteración puede mejorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos cinco residuos de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción seleccionada del grupo que consiste en

y/o los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como, entre otros, C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar al menos catorce residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128. La alteración puede empeorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para C3, C3(H₂O) y/o los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como, entre otros, C3d, C3dg e iC3b, y el procedimiento puede comprender mutar quince residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128. La al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras. La al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservadoras. La alteración puede empeorar la cinética de unión de la parte de CR2 de la construcción para los fragmentos proteolíticos de C3 unidos a la superficie celular, tales como C3d, C3dg e iC3b en cualquiera de aproximadamente un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 %, inclusive, así como cualquier valor numérico entre estos porcentajes.

15 **Composición para usar en procedimientos para tratar enfermedades o afecciones asociadas con el complemento**

Se proporcionan en la presente composiciones para usar en los procedimientos para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente. Tal como se usa en la presente, un "individuo" puede ser un vertebrado, un mamífero o un ser humano. Específicamente, tal como se usa en la presente, un "mamífero" puede ser un primate no humano, un ratón, una rata, un cerdo, un perro, un gato, un mono, una vaca o un caballo. Se entiende que la administración de la composición al individuo puede tener el efecto de, aunque no se limita a, reducir los síntomas de la afección, una reducción de la gravedad de la afección o la ablación completa de la afección.

Composición para uso en los procedimientos de tratamiento mediante inhibición de la actividad del complemento

30 En algunos aspectos, se proporciona una composición de la invención para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento, tal como se define en las reivindicaciones, en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones reivindicadas, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, y donde la administración de la composición inhibe la actividad del complemento. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α y EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2.

45 En algunos aspectos, se proporciona una composición tal como se define en las reivindicaciones para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones tal como se define en las reivindicaciones, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición inhibe la actividad del complemento; y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una afección inflamatoria. La enfermedad o afección asociada con el complemento incluye una enfermedad inflamatoria, especialmente asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis reactiva, espondilartrosis, vasculitis sistémica, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica experimental, síndrome de Sjögren, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesión por isquemia de reperusión, infarto de miocardio, mal de Alzheimer, rechazo de trasplante (alogénico y xenogénico), trauma térmico, cualquier inflamación inducida por complejos inmunitarios, glomerulonefritis, miastenia grave, lupus cerebral, síndrome de Guillain-Barré, vasculitis, esclerosis sistémica, anafilaxis, reacciones al catéter, ateroma, infertilidad, Tiroiditis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), síndrome post derivación, hemodiálisis, reumatoide juvenil, síndrome de Behçet, anemia hemolítica, pénfigo, penfigoide bulloso, apoplejía, aterosclerosis y esclerodermia. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Cry, CR1 y FH. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En

algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2.

5

En algunos aspectos, se proporciona una composición tal como se define en las reivindicaciones para usar en un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones tal como se define en las reivindicaciones, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición inhibe la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección viral. La infección viral incluye virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus sincitial respiratorio, virus del Dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre de Lassa, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la fiebre del valle de Murray, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre del Valle de Rift, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus C, virus de Sindbis, Hantavirus. En algunos aspectos, la enfermedad o afección asociada con el complemento es un resultado de la respuesta de un individuo a un vector viral. En determinadas realizaciones, el vector viral incluye, entre otros, adenovirus, virus de vaccinia, virus adenoasociado, virus vaccinia ancara modificado, citomegalovirus o cualquier otro vector viral conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .

Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición inhibe la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección fúngica. Se entiende en la técnica que *Candida* expresa una proteína tipo CR3 que tiene propiedades de unión similares a CR2. La proteína tipo CR3 *Candida* parece participar en la patogénesis. Por lo tanto, se describe un procedimiento para tratar a un individuo con una infección fúngica, donde el tratamiento bloquea la función de "CR3" fúngica e inhibe el complemento, lo que comprende administrarle a un sujeto cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este. El inhibidor del complemento se puede seleccionar del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350. La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. El o los fragmentos proteolíticos de C3 se pueden seleccionar del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas

65

del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .

La apoptosis que se produce durante el desarrollo normal es no inflamatoria y participa en la inducción de la tolerancia inmunológica. Aunque la muerte celular apoptótica puede ser inflamatoria dependiendo de cómo se active y en qué tipos de células (por ejemplo, los agentes terapéuticos que ligan Fas son capaces de inducir la inflamación), la muerte celular necrótica produce una respuesta inflamatoria sostenida y potente mediada por el contenido celular liberado y por las citocinas proinflamatorias liberadas por los fagocitos estimulados. Las células apoptóticas y las vesículas son eliminadas normalmente por los fagocitos, mediante lo cual se previenen las consecuencias proinflamatorias de la lisis celular. En este contexto, se ha demostrado que las células apoptóticas y los cuerpos apoptóticos fijan directamente el complemento, y que el complemento puede mantener una respuesta antiinflamatoria debido a la opsonización y la fagocitosis mejorada de las células apoptóticas.

La inflamación participa en el reclutamiento inespecífico de células inmunitarias que pueden influir en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. La modulación de la activación del complemento durante la terapia tumoral basada en la apoptosis para inhibir la captación fagocítica de células/cuerpos apoptóticos mejora la respuesta inmunitaria innata/inflamatoria dentro del entorno tumoral. Además, las células apoptóticas pueden ser una fuente de autoantígenos inmunogénicos y los cuerpos apoptóticos no eliminados pueden producir autoinmunización. Además de crear un entorno inmunoestimulante mejorado, la modulación del complemento en un sitio en el que se ha inducido a las células tumorales a someterse a apoptosis aumenta o desencadena inmunidad específica contra un tumor al que el hospedador normalmente es tolerante.

En consecuencia, se describe un procedimiento para mejorar el resultado de una terapia basada en apoptosis (p. ej., terapia génica con adenovirus que expresa ligando Fas) en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un inhibidor del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, y donde la administración de la composición inhibe la actividad del complemento. El inhibidor del complemento se puede seleccionar del grupo que consiste en: MCP, DAF, CD59, Crry, CR1 y FH. La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350. La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . El o los fragmentos proteolíticos de C3 se pueden seleccionar del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .

65 Composición para uso en los procedimientos de tratamiento mediante mejora de la actividad del complemento

- La composición de la invención se puede usar en procedimientos para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, y donde la administración de la composición mejora
- 5 la actividad del complemento. La mejora de la actividad del complemento puede tener el efecto de, aunque no se limita a, reducir los síntomas de la afección, una reducción de la gravedad de la afección o la ablación completa de la afección. La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350.
- 10 La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de
- 15 C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2.

Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del

20 modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición mejora la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es el cáncer. Una lista representativa, aunque no exhaustiva, de los cánceres para cuyos tratamientos se pueden utilizar las composiciones que mejoran el complemento descritas incluye: linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, micosis fungoide, mieloma múltiple,

25 enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer del sistema nervioso, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cánceres de pulmón como el cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinomas uroteliales, adenocarcinomas, sarcomas, gliomas, gliomas de alto grado, blastomas, neuroblastomas, plasmacitomas, histiocitomas, adenomas, tumores hipóxicos, mielomas, linfomas o sarcomas relacionados con el SIDA, cánceres metastásicos, neuroblastoma/glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel,

30 cáncer de hígado, melanoma, carcinomas de células escamosas de la boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama y cáncer epitelial, cáncer renal, cáncer genitourinario, cáncer pulmonar, carcinoma de esófago, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de intestino grueso, cáncer hematopoyético, cáncer testicular, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer de próstata,

35 enfermedad de Waldenstrom o cáncer de páncreas. La enfermedad o la afección asociada con el complemento puede ser una afección precancerosa tal como, entre otras, displasias de cuello uterino y anales, otras displasias, displasias graves, hiperplasias, hiperplasias atípicas y neoplasias. En determinadas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃

40 de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350. La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más

45 fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . El o los fragmentos proteolíticos de C3 se pueden seleccionar del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que

50 se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión

55 reducida para, EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3

60 y EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida

65 para, EBV gp350 e IFN α .

- La composición de la invención se puede usar en un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones reivindicadas, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición
- 5 mejora la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección viral. Una lista representativa, aunque no exhaustiva, de las infecciones virales para cuyos tratamientos se pueden utilizar las composiciones que mejoran el complemento descritas incluye: virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la varicela-zóster, herpesvirus humano 6, herpesvirus humano 7, herpesvirus humano 8, virus de la variola, virus de la estomatitis vesicular, virus de la hepatitis
- 10 A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rinovirus, coronavirus, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus del sarampión, poliomavirus, virus del papiloma humano, virus sincitial respiratorio, adenovirus, virus de Coxsackie, virus del dengue, virus de Mumps, poliovirus, virus de la rabia, virus del sarcoma de Rous, virus de la fiebre amarilla, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre de Lassa, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la fiebre del valle de Murray, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre del Valle de Rift, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus
- 15 C, virus de Sindbis, virus de la leucemia de células T humanas tipo 1, hantavirus, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia de los simios, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2. En determinadas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11 y Y64 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .
- 45 Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición mejora la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección bacteriana. Una lista representativa, aunque no exhaustiva, de las infecciones bacterianas para cuyos tratamientos se pueden utilizar las composiciones que mejoran el complemento descritas incluye infección bacteriana por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis cepa BCG*, *BCG subcepas*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *paratuberculosis subespecie M. avium*, *Nocardia asteroides*, otras especies de *Nocardia*, *Legionella pneumophila*, otras especies de *Legionella*, *Salmonella typhi*, otras especies de *Salmonella*, especies de *Shigella*, *Yersinia pestis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, otras especies de *Pasteurella*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Brucella abortus*, otras especies de *Brucella*, *Cowdria ruminantium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, otras especies de *Rickettsial*, especies de *Ehrlichia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, especies de *Campylobacter*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa*, otras especies de *Pseudomonas*, *Haemophilus Influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, otras especies de *Hemophilus*, *Clostridium tetani*, otras especies de *Clostridium*, *Yersinia enterocolitica* y otras especies de *Yersinia*. El activador del complemento se puede seleccionar del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF. La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente
- 65

- a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350. La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión
- 5 reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . El o los fragmentos proteolíticos de C3 se pueden seleccionar del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9,
- 10 Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y no se une a,
- 15 o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92,
- 20 S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .
- 25 En algunos aspectos, se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento biológicamente activo de este, donde la administración de la composición mejora la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección
- 30 parasitaria. Una lista representativa, aunque no exhaustiva, de las infecciones parasitarias para cuyos tratamientos se pueden utilizar las composiciones que mejoran el complemento descritas incluye: *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, otras especies de *Plasmodium*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, otras especies de *Leishmania*, *Schistosoma mansoni*, otras especies de *Schistosoma* y *Entamoeba histolytica*. En determinadas realizaciones, el activador del complemento se selecciona del
- 35 grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se
- 40 une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o
- 45 más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos
- 50 proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo
- 55 que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En
- 60 algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .

Se describe un procedimiento para tratar una enfermedad o una afección asociada con el complemento en un individuo

65 que comprende administrarle al individuo cualquiera de las composiciones descritas en la presente, donde la parte del modulador del complemento de la composición comprende un activador del complemento o un fragmento

biológicamente activo de este, donde la administración de la composición mejora la actividad del complemento, y donde la enfermedad o afección asociada con el complemento es una infección fúngica. Una lista representativa, aunque no exhaustiva, de las infecciones fúngicas para cuyos tratamientos se pueden utilizar las composiciones que mejoran el complemento descritas incluye: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*,
5 *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Pneumocystis carinii*, *Penicillium marneffi* y *Alternaria alternate*. El activador del complemento se puede seleccionar del grupo que consiste en: isotipo de Ig humana G₁ (IgG₁), isotipo de Ig humana M (IgM), isotipo de Ig de ratón G₃(IgG₃), Fc de IgM de ratón, dominio Fc de IgG₁ humana, dominio Fc de IgM humana, dominio Fc de IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgM de ratón, y CVF. La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV
10 gp350, pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, IFN α . La composición se puede unir selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350. La composición se puede unir selectivamente a IFN α pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero es posible que no se una
15 a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La composición se puede unir selectivamente a EBV gp350 pero es posible que no se una a, o puede tener afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . El o los fragmentos proteolíticos de C3 se pueden seleccionar del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del
20 grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A
25 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41, Y64 y K67 y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92,
30 S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . La parte de CR2 de la composición puede tener una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y es posible que no se una a, o puede tener eficiencia de unión reducida para, EBV gp350 e IFN α .

35 dominio, dominio Fc de IgM de ratón y CVF. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350, pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α , pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, EBV gp350 y uno o más fragmentos
40 proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a IFN α y EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la composición se une selectivamente a EBV gp350 pero no se une a, o tiene afinidad de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, el o los fragmentos proteolíticos de C3 se seleccionan del grupo que consiste en C3d, iC3b, C3dg y uno o más fragmentos unidos a células de C3b que se unen a los dos dominios de SCR de extremo N de CR2. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93,
45 A97, T100, N101, S109 y S128 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, N11, R36, K41,
50 Y64 y K67 y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 y EBV gp350. En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109, S128, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, uno o más fragmentos proteolíticos de C3 e IFN α . En algunas realizaciones, la parte de CR2 de la composición tiene una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: N11, R36, K41, Y64 K67, S42A y K50A y no se une a, o tiene eficiencia de unión reducida para, EBV
60 gp350 e IFN α .

EJEMPLOS

Los ejemplos, que se pretende que sean puramente ilustrativos de la invención y por lo tanto no deberían ser
65 considerados limitantes de la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención planteada anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo ilustrativo

y no limitativo. Si bien la invención precedente se ha descrito con cierta minuciosidad a modo ilustrativo y de ejemplo a los efectos de lograr claridad en la comprensión, será evidente para los expertos en la técnica en virtud de los principios de la presente invención que podrán realizarse ciertos cambios y modificaciones a las mismas sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

EJEMPLO 1: IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA LAS INTERACCIONES DE UNIÓN A CR2 CON EBV gp350 E IFN α .

Procedimientos experimentales

10

Expresión y purificación de proteínas recombinantes

CR2 SCR1-2 humano para NMR y estudios de calorimetría de titulación isotérmica ("ITC") se expresaron en *Pichia pastoris* utilizando un fermentador BioFlo™ 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) como se describió anteriormente (46). En resumen, se cultivó una única colonia en 5 ml de medio de sal basal de *Pichia* que contenía glicerol al 1 % (BMG, por litro: ácido fosfórico al 85 % 26,7 ml, sulfato de calcio 0,93 g, sulfato de potasio 18,2 g, sulfato de magnesio-heptahidrato 14,9 g, hidróxido de potasio 4,13 g, glicerol 10,0 g, agua desionizada destilada hasta 1 litro) durante la noche a 30 °C y 250 rpm, se amplió a 50 ml BMG (24 h) y por último se expandió a 300 ml BMG (24 h). Se centrifugó el cultivo de inoculación a 2500xg 25 °C y se resuspendió en 30 ml de BMG. El cultivo de inoculación de 30 ml se utilizó para inocular 1 L de medio de sal basal de *Pichia* mínimo que contenía 40 g de glicerol. Se mantuvo la concentración del O₂ disuelto al 40 %, la temperatura a 30 °C y el pH a 5,0 utilizando KOH 2 M. Las alimentaciones iniciales eran alimentaciones de glicerol en lotes; la transición al metanol fue facilitada por una inyección de metanol antes de que se iniciara un perfil exponencial de alimentación de metanol. La inducción de metanol duró dos días, después de los cuales se centrifugó el cultivo para eliminar los restos celulares. Se intercambió el sobrenadante en formiato 10 mM pH 4,0 antes de pasarse por una columna de SP-Sepharose (2 x 5 mL columnas SP HiTrap™, GE Biosciences, Pittsburgh, PA) seguido de una columna de afinidad de CR2, generada de forma interna mediante la unión de GST-C3d a una columna GSTrap™ (GE Biosciences, Pittsburgh, PA). Se eluyó CR2 junto con un gradiente lineal de NaCl creciente, 0-1,0 M en 1/3X solución salina amortiguada con fosfato (PBS, MgCl₂ 1,6 mM, KCl 0,9 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaCl 45,6 mM, Na₂HPO₄ 2,7 mM pH 7,4). Por último, se purificó CR2 SCR1-2 mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitorizó la pureza y la identidad de CR2 mediante SDS-PAGE, análisis de transferencia Western y espectrometría de masas. Las proteínas marcadas isotópicamente con ¹⁵N y ¹⁵N-¹³C se prepararon utilizando esta estrategia. Para CR2 marcado isotópicamente con ¹⁵N, se utilizó sulfato de amonio ¹⁵N. Para CR2 marcado isotópicamente con ¹⁵N-¹³C, se utilizaron sulfato de amonio ¹⁵N, glicerol ¹³C y metanol ¹³C. Los productos químicos enriquecidos isotópicamente se adquirieron de Isotec Inc., Miamisburg, OH.

35

Se generó CR2 SCR1-2 humano para los estudios de ITC utilizando el sistema de expresión pMAL-P2X™ (New England Biolabs, Ipswich, MA) en *E. coli* tal como se describió anteriormente (42, 43). Se utilizaron colonias resistentes a ampicilina para iniciar cultivos durante la noche que se ampliaron a 1 L y se cultivaron a 37 °C hasta obtener un A₆₀₀ de 0,3. Los cultivos se indujeron con isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) 0,3 mM a 30 °C durante la noche antes de la recolección mediante centrifugado. Los sedimentos recolectados se resuspendieron en amortiguador de columna de amilosa (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM) y se lisaron mediante sonicación. Se aclaró el lisado mediante centrifugado y se aplicó a una columna de resina de amilosa (New England Biosciences, Ipswich, MA). Se eluyó el MBP-CR2 SCR1-2 unido de la columna utilizando amortiguador de elución de columna de amilosa (amortiguador de columna de amilosa más maltosa 10 mM). Por último, se purificó el MBP-CR2 SCR1-2 mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitorizó la pureza y la identidad de MBP-CR2 mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Se generó C3d humano para los estudios de ITC utilizando el sistema de expresión pGEX™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) en *E. coli* tal como se describió anteriormente (47). En resumen, se utilizaron colonias resistentes a ampicilina para iniciar cultivos durante la noche que se ampliaron a 1 L y se cultivaron a 37 °C hasta lograr un A₆₀₀ de 0,3. Los cultivos se indujeron con IPTG 0,3 mM a 30 °C durante la noche antes de la recolección mediante centrifugado. Los sedimentos recolectados se resuspendieron en amortiguador de columna de GST (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM) y se lisaron mediante sonicación. Se aclaró el lisado mediante centrifugado y se aplicó a una columna GSTrap™ (GE Biosciences, Pittsburgh, PA). C3d se escindió de la columna digiriendo con 50 U de trombina durante la noche a 4 °C y posteriormente se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitorizó la pureza de C3d mediante SDS-PAGE.

La purificación de una construcción truncada de EBV gp350 que comprendía los residuos 1-470 de la proteína de tipo salvaje para las titulaciones de NMR y los estudios de ITC se realizó tal como se describió anteriormente (46). gp350 se produjo mediante infección de células de insecto Sf9 con las partículas de baculovirus empaquetadas de gp350 (vector de transferencia pVI-Bac, etiqueta de polihistidina de extremo C) con una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Se concentró el sobrenadante de baculovirus, amortiguado con Tris-HCl 10 mM con imidazol 10 mM pH 7,4 y se aplicó a una columna HiTrap™ de 5 mL (GE Biosciences, Pittsburgh, PA) y posteriormente se eluyó con un gradiente lineal de imidazol. Se monitorizaron la pureza y la identidad de gp350 mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

65

Se generó IFN α humano para las titulaciones de NMR y los estudios de ITC utilizando el sistema de expresión pMAL™ (New England Biolabs, Ipswich, MA) en *E. coli* tal como se describió anteriormente (48). Se utilizaron colonias resistentes a ampicilina para iniciar cultivos durante la noche que se ampliaron a 1 L y se cultivaron a 37 °C hasta obtener un A600 de 0,3. Los cultivos se indujeron con IPTG 0,3 mM a 25 °C durante la noche antes de la recolección mediante centrifugado. Los sedimentos recolectados se resuspendieron en amortiguador de columna de amilosa (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM) y se lisaron mediante sonicación. Se aclaró el lisado mediante centrifugado y se aplicó a una columna de resina de amilosa (New England Biosciences, Ipswich, MA). Se eluyó el MBP-IFN α unido de la columna utilizando amortiguador de elución de columna de amilosa (amortiguador de columna de amilosa más maltosa 10mM). Después de la elución, se escindió la etiqueta de MBP durante la noche a 4 °C con Factor Xa (New England Biosciences, Ipswich, MA). Por último, se purificó IFN α mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitorizó la pureza y la identidad de IFN α mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

Análisis NMR

Los experimentos de NMR se realizaron en imanes Varian de 600, 800 y 900 MHz ubicados en el centro de NMR Rocky Mountain Regional del campus de la Facultad de Medicina de la Universidad de Colorado Denver (UCDSOM) (600 y 900 MHz) y en el centro de NMR de W. M. Keck High Field en el campus de la Universidad de Colorado Boulder (800 MHz). Se utilizaron dominios de SCR1-2 de CR2 marcados uniformemente con ¹⁵N-¹³C en 1/3X PBS para asignar secuencialmente el 15N-TROSY-HSQC (49) utilizando HNCACB (50), CBCA(CO)NH (51) y espectros tridimensionales NOESY-HSQC (52) editados con ¹⁵N. Los datos de NMR se procesaron con nmrPipe (53) y se analizaron con ccpNMR (54). Se monitorizaron los cambios de desplazamiento químico utilizando ccpNMR mediante la superposición de espectros TROSY-HSQC de CR2 SCR1-2 libre y CR2 SCR1-2 con concentraciones crecientes de EBV gp350 o IFN α .

25 Análisis de calorimetría de titulación isotérmica ("ITC")

Se llevaron a cabo experimentos de ITC en un Microcal VP-ITC (GE Healthcare, Piscataway, NJ) alojado en la instalación de Biophysics Core en el campus de UCDSOM. Se utilizó SCR1-2 de CR2 en 1/3X PBS en los experimentos de titulación llevados a cabo a 20 °C. Cada experimento de titulación consistió en una inyección de 5 μ l seguida de 26 inyecciones de 10 μ l de concentraciones graduadas de C3d, gp350 o IFN α . Los datos se analizaron utilizando el software proporcionado por el fabricante (Origin, versión 7.0 MicroCal) que utiliza modelos de unión de un solo sitio o de dos sitios (55).

Análisis de desplazamiento químico

Utilizando las asignaciones de resonancia descritas anteriormente (48), se titularon los ligandos EBV gp350 e IFN α de longitud completa en muestras de SCR1-2 de CR2 marcadas uniformemente con ¹⁵N y se monitorizaron los desplazamientos químicos ¹H-¹⁵N (figuras 1 - 3). La titulación con EBV gp350 proporcionó un modo simple de unión caracterizado por la desaparición y reaparición de resonancias específicas, lo cual indica una interacción de unión fuerte. Los residuos en SCR1-2 de CR2 que presentaban cambios en el desplazamiento químico con EBV gp350 fueron N11, R13, A22, R28, S32, R36, K41, K57, Y64, K67, Y68, R83, G84 y R89. Esos residuos abarcan SCR1, SCR2 y la región enlazadora inter-SCR entre SCR1-2 de CR2 (figuras 3 y 4A). Las magnitudes del cambio en el desplazamiento químico se muestran en la figura 3. Estos resultados sugieren que el enlazador inter-SCR entre SCR1-2 y un reborde en SCR1 desempeña el papel más importante en la ligación de gp350 con CR2 (figura 3). Debido a que esta interacción está bajo un intercambio lento en la escala de tiempo de NMR, solo se puede calcular un límite superior K_d. El K_d se calculó utilizando la diferencia de cambio químico mínima observada entre las resonancias libres y unidas (aproximadamente 60 Hz); asumiendo una tasa limitada por difusión de $\sim 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, un límite superior a unión constante se calculó como $\sim 60 \mu\text{M}$ (tabla I).

El IFN α de longitud completa también se tituló en muestras de SCR1-2 de CR2 marcadas uniformemente con ¹⁵N y se monitorizaron los desplazamientos químicos ¹H-¹⁵N (figura 2). La titulación con la citocina IFN α proporcionó un modo simple de unión similar al de la ligación de gp350 y, por ende, una interacción fuerte. Los residuos en SCR1-2 de CR2 que presentan cambios en el desplazamiento químico son R13, Y16, R28, S42, K48, K50, Y68, R83, G84 y R89. Estos residuos abarcan SCR1, SCR2 y la región enlazadora inter SCR de CR2 (figuras 3 y 4B). Las magnitudes del cambio en el desplazamiento químico se muestran en la figura 3. Estos resultados sugieren que la superficie de unión a IFN α es similar a la superficie de unión a C3d (figura 3). De forma similar a los cambios en el desplazamiento químico de gp350, los cambios en el desplazamiento químico para IFN α sugieren una más fuerte que visible mediante la escala de tiempo de NMR; se calculó el límite superior K_d como antes para que sea $\sim 70 \mu\text{M}$ (tabla I).

A efectos de comparación, los residuos exclusivos y compartidos en CR2 necesarios para la ligación mediante C3d, gp350 e IFN α se muestran en la figura 4C. El cambio en la magnitud del desplazamiento químico para cada estado de ligación se muestra en la figura 3.

Resultados

65 Análisis de desplazamiento químico

- Utilizando las asignaciones de resonancia descritas anteriormente (48), se titularon los ligandos EBV gp350 y IFN α de longitud completa en muestras de SCR1-2 de CR2 marcadas uniformemente con ^{15}N y se monitorizaron los desplazamientos químicos ^1H - ^{15}N (figuras 1 - 3). La titulación con EBV gp350 proporcionó un modo simple de unión caracterizado por la desaparición y reaparición de resonancias específicas, lo cual indica una interacción fuerte. Los residuos en SCR1-2 de CR2 que presentan cambios en el desplazamiento químico son N11, R13, A22, R28, S32, R36, K41, K57, Y64, K67, Y68, R83, G84 y R89. Estos residuos abarcan SCR1, SCR2 y la región enlazadora inter SCR de CR2 (figuras 3 y 4A). Las magnitudes del cambio en el desplazamiento químico se muestran en la figura 3. Estos resultados sugieren que el enlazador inter SCR y un reborde en SCR1 desempeñan el papel más importante en la ligación de gp350 con CR2 (figura 3). Debido a que esta interacción está bajo un intercambio lento en la escala de tiempo de NMR, solo se puede calcular un límite superior K_d . El K_d se calculó utilizando la diferencia de cambio químico mínima observada entre las resonancias libres y unidas (aproximadamente 60 Hz); asumiendo una tasa limitada por difusión de $\sim 10 \times 8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, un límite superior a unión constante se calculó como $\sim 60 \mu\text{M}$ (tabla I).
- El IFN α de longitud completa también se tituló en muestras de SCR1-2 de CR2 marcadas uniformemente con ^{15}N y se monitorizaron los desplazamientos químicos ^1H - ^{15}N (figura 2). La titulación con la citocina IFN α proporcionó un modo simple de unión similar al de la ligación de gp350 y, por ende, una interacción fuerte. Los residuos en SCR1-2 de CR2 que presentan cambios en el desplazamiento químico son R13, Y16, R28, S42, K48, K50, Y68, R83, G84 y R89. Estos residuos abarcan SCR1, SCR2 y la región enlazadora inter-SCR entre SCR1-2 de CR2 (figuras 3 y 4B). Las magnitudes del cambio en el desplazamiento químico se muestran en la figura 3. Estos resultados sugieren que la superficie de unión a IFN α es similar a la superficie de unión a C3d (figura 3). De forma similar a los cambios en el desplazamiento químico de gp350, los cambios en el desplazamiento químico para IFN α sugieren una interacción de unión más fuerte que visible mediante la escala de tiempo de NMR; se calculó el límite superior K_d como antes para que sea $\sim 70 \mu\text{M}$ (tabla I). A efectos de comparación, los residuos exclusivos y compartidos en CR2 necesarios para la ligación mediante C3d, gp350 y IFN α se muestran en la figura 4C. El cambio en la magnitud del desplazamiento químico para cada estado de ligación se muestra en la figura 3.

Termodinámica de las interacciones de ligando de CR2

- Se utilizó ITC para determinar las afinidades de unión de las interacciones de ligando de CR2. De forma consistente con los análisis del desplazamiento químico de NMR, se determinó que la interacción entre CR2 y C3d es una unión de dos sitios basada en la bondad de ajuste de un modelo de unión de dos sitios en lugar de un modelo de unión de un solo sitio. Las dos afinidades son $0,13 \pm 0,05 \mu\text{M}$ y $160 \pm 20 \mu\text{M}$. La interacción entre CR2 y gp350 se ajustó utilizando un modelo de unión de un solo sitio que proporcionó una afinidad de $0,014 \pm 0,009 \mu\text{M}$. La interacción entre CR2 y IFN α se ajustó utilizando un modelo de unión de un solo sitio que proporcionó una afinidad de $0,035 \pm 0,008 \mu\text{M}$. Los resultados de todos los parámetros termodinámicos de las afinidades derivadas de NMR y ITC se enumeran en la tabla 1.

Análisis

- Los estudios descritos en la presente utilizaron dos enfoques para estudiar las interacciones de ligando de CR2 con EBV gp350 y IFN α en la fase fluida: (1) experimentos de espectroscopía NMR en los que se tituló gp350 o IFN α de longitud completa en SCR1-2 de CR2 marcado en ^{15}N y se monitorizaron los cambios químicos; y (2) ITC para caracterizar adicionalmente y determinar las constantes de unión para cada interacción de ligando de CR2.
- Los análisis anteriores mostraron que tanto SCR1 como 2 eran necesarios para la unión de gp350 (1, 12, 20, 56, 57). Además, también se informó que áreas específicas de SCR1-2 eran importantes en la unión de gp350 (20, 58). Estas áreas estaban entre el primer y el segundo, el segundo y el tercer residuos de cisteína de SCR1, y la segunda mitad de SCR2; los aminoácidos incluían de R89 a R96 y de T100 a S128 en SCR2 (58). Las interacciones con el enlazador también se infirieron mediante el hallazgo de que la introducción de un sitio de glicosilación en el enlazador eliminó gp350, pero no la unión a C3d (20, 31, 57). Más recientemente se ha demostrado que hay aminoácidos específicos que interactúan en la superficie de SCR1-2 de CR2. Los estudios de mutagénesis sugieren que los residuos R13, S15, R28, R36, K41, K56, K67, R83 y R89 son los residuos más importantes en la interacción CR2-gp350 (42, 43). Además, utilizando HADDOCK, se determinó un modelo de interacción donde la región enlazadora entre los dominios uno y dos de gp350 interactúa con el enlazador entre SCR1 y SCR2 de CR2 (43).

- Sin embargo, aunque ha habido sugerencias de regiones importantes y más recientemente aminoácidos que son importantes en la interacción entre CR2 y gp350, no ha habido evidencia física de que estas interacciones ocurran. Los datos descritos en la presente ilustran residuos de aminoácidos importantes para la interacción CR2-gp350 (figura 4A). Los residuos que se determinó que son importantes para la interacción CR2-gp350 son N11, R13, A22, R28, S32, R36, K41, K57, Y64, K67, Y68, R83, G84 y R89. Debido a que hay múltiples interacciones dentro de la región enlazadora, es posible imaginar una reorganización de los dominios de SCR alrededor de la región enlazadora tras la unión a gp350 y así permitir que se encuentren todos los puntos de contacto. Si ese es el caso, algunos de estos residuos identificados en la presente como importantes para la interacción pueden estar implicados en la reorganización estructural tras la unión y no los sitios de estrecho contacto de aminoácidos. Algunas resonancias desaparecen debido al gran tamaño del complejo ligado, aproximadamente 110 kDa, y el aumento del tiempo de caída

resultante; por lo tanto, son necesarias técnicas alternativas de etiquetado para observar dichas resonancias.

Estos datos parecen confirmar que la región enlazadora es importante en la interacción CR2-gp350. Se ha demostrado que la interacción del enlazador es importante en los datos derivados de mutagénesis así como en el modelo de acoplamiento suave de HADDOCK (43). La región enlazadora entre SCR1 y SCR2 es de ocho aminoácidos, uno de los más largos en las proteínas que contienen SCR y, por ende, es probable que sea lo suficientemente flexible para mediar las interacciones de múltiples ligandos. A diferencia de la interacción CR2-C3d, nuestros datos sugieren que dos residuos en la región enlazadora, K67 y Y68, son importantes en la interacción CR2-gp350. Por ende, con un residuo cargado, K67, y un residuo que contiene hidroxilo, Y68, es probable que la interacción con el enlazador sea más fuerte en la interacción CR2-gp350 que con la interacción CR2-C3d. Esta información proporciona un comienzo para definir cómo CR2 puede mediar múltiples interacciones de ligandos específicas.

Tal como con la interacción CR2-C3d (59, 60), es probable que la interacción CR2-gp350 sea impulsada en gran medida por interacciones electrostáticas como resulta evidente por la gran cantidad de residuos cargados entre los importantes en la interacción CR2-gp350. La mayoría de estos residuos cargados se encuentran en SCR1, lo que sugiere que este dominio desempeña un papel más significativo en la interacción CR2-gp350. Resulta interesante que también se determinó que R83 es importante en CR2-gp350, aunque no se mostró que muchos otros residuos alrededor de R83 presenten cambios en el desplazamiento químico durante la interacción CR2-C3d. Estos datos, junto con la interacción débil encontrada en la interacción CR2-C3d, pueden significar que la interacción de R83 es más importante en la atracción electrostática inicial de gp350 con CR2 que con contactos de aminoácidos significativos. Los residuos cargados que se identificaron en este estudio coinciden con el modelo de HADDOCK (42, 43). Nuevamente, tal como con el mapa de unión de NMR de CR2-C3d, se descubrió que hay más residuos que solo los residuos cargados implicados en la interacción CR2-gp350. Específicamente, tres aminoácidos que contienen hidroxilo (S32, Y64 y Y68) son importantes en la interacción CR2-gp350. Estas interacciones de cadena lateral son probablemente interacciones de enlaces de hidrógeno. Estos datos nuevos sugieren que es probable que los sitios de unión de CR2-gp350 y CR2-C3d sean similares, lo que explica por qué los ligandos compiten, sin embargo, hay diferencias sustanciales que comienzan a explicar cómo se produce la unión selectiva.

El modelo de HADDOCK se adecúa a los residuos de unión de CR2-gp350 determinados por NMR (figura 5). Todos los residuos menos dos, K57 y A22, se encuentran dentro de la cara de unión hipotética derivada del modelo de HADDOCK. Es probable que el desplazamiento químico de A22 se deba a un cambio de conformación leve en SCR1 tras la unión de CR2 a gp350. Mientras que la interacción de K57 descrita mediante NMR se puede utilizar para activar un modelo de acoplamiento diferente y de energía potencialmente inferior, ya que no fue utilizada como un residuo activo en el enfoque de acoplamiento simulado de Young y *col.* (43).

La interacción CR2-IFN α se ha caracterizado de varias maneras. La primera comenzó con la investigación de similitudes de secuencia entre los sitios de unión de CR2 propuestos en C3d y gp350 (19). Para confirmar adicionalmente la interacción de unión potencial, se descubrió que los anticuerpos elevados contra las secuencias peptídicas del sitio de unión de CR2 propuesto en IFN α inhibe la interacción CR2-C3d en los ensayos de unión celular. También se descubrió que la unión de IFN α a CR2 inhibe la formación de complejos CR2-C3d en los ensayos de unión celular. Además, se descubrió que IFN α inhibía el recubrimiento de CR2 por gp350, actuando así como un inhibidor antiviral de infección de fase temprana de EBV (18). Más recientemente, se ha completado un estudio biofísico sobre las propiedades termodinámicas de las interacciones de ligando de CR2, lo que indica la unión física de CR2 y IFN α (17). Los datos presentados en la presente además definen un sitio de unión o superficie de unión para la interacción CR2-IFN α . Utilizando estudios de titulación de NMR, se identificó que los siguientes aminoácidos están implicados en la interacción CR2-IFN α , R13, Y16, R28, S42, K48, K50, Y68, R83, G84 and R89.

Tal como con otras interacciones de ligando de CR2, la interacción CR2-IFN α está impulsada en gran medida por interacciones electrostáticas. La interacción CR2-IFN α es probablemente la más cercana relacionada con la interacción de C3d, ya que los motivos de unión a CR2 propuestos de C3d y IFN α son los más cercanos. Además, parece que el mismo residuo de región enlazadora, Y68, experimenta perturbaciones significativas tras la adición de C3d y IFN α , así como la misma disposición general de residuos implicados en ambas interacciones (figura 4C).

Los estudios termodinámicos de interacciones de ligando de CR2 proporcionaron resultados ligeramente diferentes (tabla 2). Tal como se informó anteriormente, la interacción CR2-C3d se describió como una interacción de unión de dos sitios o de un solo sitio (17, 48). Los datos de ITC presentados en la presente se adecúan mejor a un modelo de dos sitios con un Kd más débil de 160 μ M y una interacción más fuerte de 0,13 μ M. Este Kd está bastante cerca del Kd determinado anteriormente de un estudio biofísico basado en resonancia de plasmones superficiales (SPR) (17). Utilizando ITC, se puede por primera vez medir en la fase fluida las dos afinidades separadas para los dos eventos de unión únicos. La interacción CR2-C3d es única en que todas las otras interacciones de ligando de CR2 caracterizadas se adaptan a un isoterma de unión de uno en uno simple. En cambio, el estudio de ITC actual de la interacción CR2-gp350 se adapta mejor a un isoterma de unión simple con un Kd de 0,014 μ M, una afinidad solo ligeramente más fuerte que el Kd informado anteriormente de 0,077 μ M determinado mediante SPR. La diferencia en afinidades aquí puede ser debida a las condiciones experimentales diferentes de los estudios respectivos. Finalmente, los datos de ITC para la interacción CR2-IFN α se adaptan mejor a un isoterma de unión simple con un Kd de 0,036 μ M, una afinidad en excelente acuerdo con el Kd informado anteriormente de 0,042 μ M determinado mediante SPR. Nuevamente, es

probable que la diferencia sea debido a la diferencia en los amortiguadores utilizados, así como las diferencias en cada ensayo, donde los experimentos de ITC utilizaron CR2 y IFN α puramente en solución, mientras que los estudios de SPR utilizaron CR2 fijo a un soporte sólido. El orden clasificado de fuerza de unión tiene sentido en que tanto la unión a IFN α como la unión a gp350 inhiben la unión de C3d a CR2, que se ha informado anteriormente (17, 18).

5

Bibliografía

EJEMPLO 2: ENSAYOS DE UNIÓN.

10 **Procedimientos experimentales**

Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

SCR1-2 de CR2 mutagenizado y humano natural para estudios de unión se expresa en *Pichia pastoris* utilizando un fermentador BioFlo™ 110 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) como se describió anteriormente (46) y como se establece en el ejemplo 1 anterior. En resumen, se cultiva una única colonia en 5 ml de medio de sal basal de *Pichia* que contiene glicerol al 1 % (BMG, por litro: ácido fosfórico al 85 % 26,7 ml, sulfato de calcio 0,93 g, sulfato de potasio 18,2 g, sulfato de magnesio-7H₂O 14,9 g, hidróxido de potasio 4,13 g, glicerol 10,0 g, agua desionizada destilada hasta 1 litro) durante la noche a 30 °C y 250 rpm, se amplió a 50 ml BMG (24 h) y por último se expandió a 300 ml BMG (24 h). Se centrifuga el cultivo de inoculación a 2500xg 25 °C y se resuspendió en 30 ml de BMG. El cultivo de inoculación de 30 ml se utiliza para inocular 1 L de medio basal de *Pichia* mínimo que contenía 40 g de glicerol. Se mantiene la concentración del O₂ disuelto al 40 %, la temperatura a 30 °C y el pH a 5,0 utilizando KOH 2 M. Las alimentaciones iniciales son alimentaciones de glicerol en lotes; la transición al metanol es facilitada por una inyección de metanol antes de que se inicie un perfil exponencial de alimentación de metanol. La inducción de metanol dura dos días, después de los cuales se centrifuga el cultivo para eliminar los restos celulares. Se intercambia el sobrenadante en formiato 10 mM pH 4,0 antes de pasarse por una columna de SP-Sepharose (2 x 5 mL columnas SP HiTrap™, GE Biosciences, Pittsburgh, PA) seguido de una columna de afinidad de CR2, generada de forma interna mediante la unión de GST-C3d a una columna GStrap™ (GE Biosciences, Pittsburgh, PA). Se eluye CR2 junto con un gradiente lineal de NaCl creciente, 0-1,0 M en 1/3X solución salina amortiguada con fosfato (PBS, MgCl₂ 1,6 mM, KCl 0,9 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, NaCl 45,6 mM, Na₂HPO₄ 2,7 mM pH 7,4). Finalmente, SCR1-2 de CR2 humano natural y mutante se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitoriza la pureza y la identidad de CR2 mediante SDS-PAGE, análisis de transferencia Western y espectrometría de masas.

Se genera C3d humano para estudios de unión utilizando el sistema de expresión pGEX™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) en *E. coli* como se describió anteriormente (47) y como se establece en el ejemplo 1 anterior. En resumen, se utilizan colonias resistentes a ampicilina para iniciar cultivos durante la noche que se amplían a 1 L y se cultivan a 37 °C hasta lograr un A₆₀₀ de 0,3. Los cultivos son inducidos con IPTG 0,3 mM a 30 °C durante la noche antes de la recolección mediante centrifugado. Los sedimentos recolectados se vuelven a suspender en amortiguador de columna de GST (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM) y se lisan mediante sonicación. Se aclara el lisado mediante centrifugado y se aplica a una columna GStrap™ (GE Biosciences, Pittsburgh, PA). C3d se escinde de la columna digiriendo con 50 U de trombina durante la noche a 4 °C y posteriormente se purifica mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Se monitoriza la pureza de C3d mediante SDS-PAGE.

EBV gp350 se aísla de las células infectadas en cultivo mediante cromatografía de inmutafinidad utilizando anticuerpos anti-gp350 disponibles comercialmente y procedimientos estándar. IFN α humano se adquiere de proveedores comerciales.

Ensayos de unión.

La unión de SCR1-2 de CR2 natural humano a EBV gp350, IFN α y C3d se compara con la de variantes de SCR1-2 de CR2 humano que contienen una o más mutaciones en aminoácidos que se determinó que son esenciales para las interacciones de unión entre CR2 y EBV gp350 o IFN α mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se realizan ensayos de unión iniciales con variantes de CR2 que contienen alanina ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono β del aminoácido sin alterar la conformación de la cadena principal (como a veces lo hace la glicina o la prolina) ni imponer efectos estéricos o electrostáticos extremos. Las siguientes variantes de SCR1-2 de CR2 se evalúan para detectar la unión a EBV gp350 y a C3d en experimentos separados: SCR1-2 N11A, SCR1-2 N11A + R36A, SCR1-2 N11A + R36A + K41A, SCR1-2 N11A + R36A + K41A + Y64A y SCR1-2 N11A + R36A + K41A + Y64A + K67A. Las siguientes variantes de SCR1-2 de CR2 se evalúan para detectar la unión a IFN α y C3d en experimentos separados: S42A y S42A + K50A. El efecto de las sustituciones de aminoácidos en la cinética de unión de CR2 y otras propiedades (p. ej., la especificidad de unión) se evalúan mediante la comparación de la unión de variantes de SCR1-2 de CR2 a EBV gp350 o IFN α y C3d con la unión de SCR1-2 de CR2 natural con los mismos ligandos. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras alternativas se evalúan en experimentos posteriores.

Se recubren placas de micropocillos de ELISA (Corning Life Sciences, Nueva York, N.Y., EUA) durante la noche a 4 °C con una cantidad adecuada de EBV gp350, IFN α o C3d purificado obtenido como se describió anteriormente en

NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,6. Las placas recubiertas luego se lavan con PBS de 1X tres veces durante un minuto cada una, y después se incuban con 200 µl de solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 5 mg/ml (BSA) en PBST) a 37 °C durante 1 hora. Cada pocillo se lava con PBST (Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0,05%-0,1% (v/v)) seis veces durante un minuto cada uno. Después, las placas se incuban con concentraciones
 5 crecientes de SCR1-2 de CR2 natural humano y diversas variantes de SCR1-2 de CR2 en PBS durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C.

Después de que la reacción de unión se completa, las placas se lavan nuevamente con PBST seis veces durante un
 10 minuto cada una. Luego, las placas se incuban con anticuerpo primario anti-CR2, se lavan seis veces durante un minuto cada una con solución de bloqueo y luego se incuban con el anticuerpo secundario, IgG antihumana de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante específica para Fcγ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluida 1:10.000 en PBST+BSA 5 mg/ml, a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavan nuevamente seis veces con PBST+BSA 5 mg/ml a temperatura ambiente y se desarrollan mediante la adición de 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), preparada en fosfato de citrato 50 mM. Después de la adición de la solución de
 15 TMB, las placas se incuban durante treinta minutos a temperatura ambiente y luego se mide la absorbancia en 450 nm con un lector de microplacas MRX (Dy nex Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se construyen curvas de unión a partir de datos brutos y se estiman afinidades de unión.

Alternativamente, las afinidades de unión se determinan con más precisión mediante análisis de resonancia de
 20 plasmones superficiales utilizando, por ejemplo, un sistema de SPR BIAcore™ 4000 (Biacore Life Sciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Como ELISA, las placas de micropocillos se recubren con EBV gp350, IFNα o C3d y luego se incuban con concentraciones crecientes de SCR1-2 de CR2 natural humano o las variantes de SCR1-2 de CR2. A diferencia de ELISA, sin embargo, SPR mide las afinidades de unión directamente y no requiere el uso de una etiqueta detectable.

25 Las variantes N11A, SCR1-2 N11A + R36A, SCR1-2 N11A + R36A + K41A, SCR1-2 N11A + R36A + K41A + Y64A, and SCR1-2 N11A + R36A + K41A + Y64A + K67A de SCR1-2 se evalúan para detectar la afinidad de unión para EBV gp350 y se observa que tienen afinidad de unión progresivamente menor para EBV gp350 mientras que mantienen esencialmente la misma afinidad de unión para C3d como SCR1-2 de CR2 natural. Las variantes S42A y
 30 SCR1-2 y S42A + K50A de SCR1-2 se evalúan para detectar la afinidad de unión para IFNα y se observa que tienen afinidad de unión progresivamente menor para IFNα mientras mantienen esencialmente la misma afinidad de unión para C3d como SCR1-2 de CR2 natural.

SECUENCIAS

35 SEQ ID NO:1 [secuencia de aminoácidos completa del receptor del complemento humano 2 (CR2)]:

MGAAGLLGVFLALVAPGVLGISCGSPPPILNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFRLLIGE
 KSLLCITKDKVDGTWDKPAKCEYFNKYSSCPEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFAC
 KTNFSMNGNKS VWCQANNMWGPTRLPTCVSVFPLECPALPMIHNGHHTSENVGSIA
 PGLSVTYSCESGYLLVGEKIINCLSSGKWSAVPPTCEEARCKSLGRFPNGKVKEPPILR
 VGV TANFFCDEGYRLQGPPSSRCVIAGQGVAWTKMPVCEEIFCPSPPILNGRHIGNS
 LANVSYGSIVTYTCDPDPEEGVNFILIGESTLRCTVDSQKTGTWSGPAPRCELSTSAV
 QCPHPQILRGRMVSGQKDRYTYNDTVIFACMFGFTLKGSKQIRCNAQGTWEPSAPV
 CEKECQAPPNILNGQKEDRHMVRFDPGTSIKYSCNPGYVLVGEESIQCTSEGVWTPP
 VPQCKVAACEATGRQLLTKPQHQFVRPDVNSSCGEGYKLSGSVYQECQGTIPWFME
 IRLCKEITCPPPPVIYNGAHTGSSLEDFPYGTTVTYTCNPGPERGVEFSLIGESTIRCTSN

DQERGTWSGPAPLCKLSLLAVQCShVHIANGYKISGKEAPYFYNDTVTFKCYSGFTL
KGSSQIRCKRDNTWDPEIPVCEKGCQPPPGLHHGRHTGGNTVFFVSGMTVDYTCDP
GYLLVGNKSIHCMPSGNWSPSAPRCEETCQHVRQSLQELPAGSRVELVNTSCQDGY
QLTGHA YQMCQDAENGIWFKKIPLCKVIHCHPPPVI VNGKHTGMMMAENFLYGNEVS
YECDQGFYLLGEKNCSAEVILKAWILERAFFPQCLRS LCPNPEVKHGYKLNKTHSAYS
HNDIVYVDCNPGFIMNGSRVIRCHTDNTWVPGVPTCIKKAFIGCPPPPKTPNGNHTGG
NIARFSPGMSILYSCDQGYLVVGEPLLLCTHEGTWSQPAPHCKE VNCSSPADMDGIQ
KGLEPRKMYQYGAVVTLECEDGYMLEGSPQSQCQSDHQWNPPLAVCRSRSLAPVL
CGIAAGLILLTFLIVITLYVISKHRERNYYTDT SQKEAFHLEAREVYSVDPYNPAS

SEQ ID NO:2 [secuencia de aminoácidos de los dominios 1 y 2 de repeticiones de consenso cortas (SCR) de CR2]:

ISCGSPPI LNGRISYYSTPIAVGTVIRYSCSGTFR LIGEKSLLCITKDKVDGTW DKPAP
KCEYFNKYSSCEPIVPGGYKIRGSTPYRHGDSVTFACKTNFSMNGNKS VWCQANN

5 MWGPTRLPTCVS

SEQ ID NO:3 [secuencia de aminoácidos de la proteína CD59 humana]:

MGIQGGSVLFGLLLVLAVFCHSGHSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDA CLITKAG
LQVYNKCWKFEHCNFDVTTTRLRENELTYCCKKDL CNFNEQLENGGTSLS EKTVL
LLVTPFLAAAWSLHP

10

SEQ ID NO:4 [secuencia de aminoácidos del gen/proteína y relacionado con el receptor del complemento de ratón 1 (Crry)]:

MEVSSRSSEPLDPVWLLVAFGRGGVKLEVLLL FLLPFTLGELRGGLGKHGHTVHREP
AVNRLCADSKRWSGLPVSAQRPFPMGHCPAPS QLP SAKPINLTDESMFPIGTYLLYEC
LPGYIKRQFSITCKQDSTWTS AEDKCIRKQCKTPSDPENGLVHVHTGIQFGSRINYTC
NQGYRLIGSSSAVCVITDQSDVDWDEAPICEWIPCEIPP GIPNGDFFSSTREDFHYGMV
VTYRCNTDARGKALFNLVGEP SLYCTSNDGEIGVWSGPPPQCIELNKCTPPPYVENA
VMLSENRS LFSLRDIVEFRCHPGFIMKGASSVHCQSLNKWEP ELPSCFKGVICRLPQE
MSGFQKGLGMKKEYYYGENVTLECEDGYTLEGSSQSQCQSDG SWNP LLAKCVSRSI
SGLIVGIFIGIIVFILVIIVFIWMILKYK KRNTTDEKYKEVGIHLNYKEDSCVRLQSL LTS
QENSSTTSPARNSLTQEVS

15 SEQ ID NO:5 [secuencia de aminoácidos de factor H humano]:

MRLLA KII CLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEIL TGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRS

LGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTDFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYT
CNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKIVSSAMEPDREYHF
GQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIIYK
ENERFQYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPYIPNGDYSPLRIKHR
TGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRR
PYFPVAVGKYYSYCYDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPA VPCLRKCYPYLENGY
NQNYGRKFVQGKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSIDI
ENGFISESQYTYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPV
FMNARTKNDFTWFKLNDTLDYECHDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYEREC
ELPKIDVHLPDRKKDQYKVGVELKFSCKPGFTIVGPNSVQCYHFGLSPDLPICKEQV
QSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPV
CIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHGVTQLP
QCVAIDKLLKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPE
VNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVSVLCQENYLIQEGEEITCKDGR
WQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEENETTCYM
GKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEEVYKCFEGFGIDGPAIAKCL
GEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGEKKDVYKAGEQVYTYTCATYYKMDGASNV
TCINSRWTGRPTCRDTSVNPPTVQNAIVSRQMSKYPSGERVRYQCRSPYEMFGDE
EVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQL
EGNKRITCRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFVC
KRGYRLSSRSHTLRTTCWDGKLEYPTCAKR

SEQ ID NO:6 [secuencia de aminoácidos de la proteína CD59A de ratón]:

MRAQRGLLLLLLLLA VFCSTAVSLTCYHCFQPVVSSCNMNSTCSPDQDSCLYAVAG
MQVYQRCWKQSDCHGEIIMDQLEETKLKFRCCQFNLCNKSDGSLGKTPLLGTSVLV
AILNLCFLSHL

5

SEQ ID NO:7 [secuencia de aminoácidos de la proteína CD59B de ratón]:

MRAQRGLLLLLLLLA VFCSTAVSLKCYNCFQFVSSCKINTTCSPNLDSCLYAVAGRQ
VYQQCWKLSDCNSNYIMSRLDVAGIQSKCCQWGLCNKNLDGLEEPNNAETSSLRKT
ALLGTSVLVAILKFCF

SEQ ID NO:8 [secuencia de aminoácidos de factor H de ratón]:

10 MRLSARIIWLLWTVCAAEDCKGPPPRENSEILSGSWSEQLYPEGTQATYKCRPGYRT

ES 2 717 912 T3

LGTIVKVCKNGKWVASNPSRICRKKPCGHPGDTPFGSFRLAVGSQFEFGAKVVYTCD
DGYQLLGEIDYRECGADGWINDIPLCEVVKCLPVTLENGRIVSGAAETDQEYFYGQ
VVRFECSNGFKIEGHKEIHCSENGLWSNEKPRCVEILCTPPRVENGDGINVKPVYKEN
ERYHYKCKHGYVPKERGDAVCTGSGWSSQPFCEEKRCSPPYILNGIYTPHRIIHRSD
EIRYECNYGFYPVTGSTVSKCTPTGWIPVPRCTLKPCFEPQFKYGRLYYEESLRPNFP
VSIGNKYSYKCDNGFSPPSGYSWDYLRCTAQQWEPEVPCVRKCVFHYVENGDSAY
WEKVYVQQQSLKVQCYNGYSLQNGQDTMTCTENGSPPPKCIRIKTCSASDIHIDN
GFLSESSSIYALNRETSYRCKQGYVTNTGEISGSITCLQNGWSPQPSCIKSCDMPVFEN
SITKNTRTWFKLNDKLDYECLVGFENEYKHTKGSITCTYYGWSDTPSCYERECVPT
LDRKLVVSPRKEKYRVGDLLEFSCHSGHRVGPDSVQCYHFGWSPGFPTCKGQVASC
APPLEILNGEINGAKKVEYSHGEVVKYDCKPRFLLKGPNKIQVDGNWTTLPVCIIEE
RTCGDIPELEHGS AKCSVPPYHHGDSVEFICEENFTMIGHGSVSCISGKWTQLPKCVA
TDQLEKCRVLKSTGIEAIKPKLTEFTHNSTMDYKCRDKQEYERSICINGKWDPEPNT
SKTSCPPPQIPNTQVIETTVKYLDGEKLSVLCQDNLYLTQDSEEMVCKDGRWQSLPR
CIEKIPCSQPPTIEHGSINLPRSSEERRDSIESSSHEHGTTFSYVCDDGFRIPENRITCYM
GKWSTPPRCVGLPCGPPPSIPLGTVSLELESYQHGEVYHCSTGFGIDGPAFIICEGG
KWS DPPKCIKTDCDVLPTVKNAIIRGKSKKSYRTGEQVTFRCQSPYQMNGSDTVTCV
NSRWIGQPVCKDNSCVDPPHPVNATIVTRTKNKYLHGDRVRYECNKPLELFGQVEV
MCENGIWTEKPKCRDSTGKCGPPPIDNGDITSLSLPVYEPLSSVEYQCQKYLLKKGK
KTITCTNGKWSEPPTCLHACVIPENIMESHNIILKWRHTEKIYSHSGEDIEFGCKYGY
KARDSPPFRTKCINGTINYPTCV

SEQ ID NO:9 [secuencia de aminoácidos del receptor del complemento humano 1 (CR1)]:

MGASSPRSEPEVGPAPGLPFCCGGSLLAVVLLALPVAWGQCNAPEWLPFARPTNL
TDEFEPPIGTYLNYECRPGYSGRPFSIICLNKNSVWTGAKDRRCRRKSCRNPPDPVNGMV
HVIKGIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIISGDTVIWDNETPICDRIPCGLPPTITNGD
FISTNRENFHYGSVVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDDQVGIWSGPAPQCIIP
NKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPS
CSRVCQPPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSP
AAPTCEVKSCDDFMGQLLNGRVLFPVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAG
MESLWNSSVPVCEQIFCPSPVIPNGRHTGKPLEVFPFGKAVNYTCDPHPDRTGTSFDLI
GESTIRCTSDPQNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFPIGTSKLY
ECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITDIQVGSRYNY
SCTTGHLIGHSSAECILSGNAAHWSTKPPICQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGS

ES 2 717 912 T3

VVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYCTSNDQVGIWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGI
LVSDNRSLFSLNEVVEFRCQPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPDPVL
HAERTQRDKDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDD
FMGQLLN GRVLFVNLQLGAKVDFVCD EGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSSVPV
CEQIFCPSPPVIPNGRHTGKPLEVFPFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQ
GNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLFAKLKTQTNASDFIGTSLKYECRPEYYGRPFS
ITCLDNLVWSSPKDVCKRKSKCTPPDPVNGMVHVITDIQVGSRINYSC TTGHR LIGHS
SAECILSGNTAHWSTKPPICQRIPCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGSVVTYRCNLGSR
GRKVFELVGEPSIYCTSNDQVGIWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGI LVSDNRSLFSLN
EVVEFRCQPGFVMKGP RRVKCQALNKWEPELPSCSRVCQPPPEILHGEHTPSHQDNF
SPGQEVFYSCEPGYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCAVKSCDDFLGQLPHGRVLFP
LNLQLGAKVSFVCD EGFRLKGSSVSHCVLVGM RSLWNNSVPVCEHIFCPNPPAILNG
RHTGTSPGDIPYGKEISYTCDPHPDRGMTFN LIGESTIRCTSDPHGNGVWSSPAPRCEL
SVRAGHCKTPEQPFASPTIPINDFEFPVGTSLNYECRPGYFGKMFSISCLENLVWSSV
EDNCRKSCGPPPEPFNGMVHINTDTQFGSTVNYSCNEGFRLIGSPSTTCLVSGNNVT
WDKKAPICEIISCEPPPTISNGDFYSNNRTSFHNGTVVTYQCHTGPDGEQLFELVGERS
IYCTSKDDQVGVWSSPPRCISTNKCTAPEVENAIRVPGNRSFFSLTEIRFCQPGFV
MVGSHTVQCQTNGRWGPKLPHCSRVCQPPPEILHGEHTLSHQDNFSPGQEVFYSCEP
SYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCTVKSCDDFLGQLPHGRVLLPLNLQLGAKVSF
VCD EGFRLKGRSASHCVLAGMKALWNSSVPVCEQIFCPNPPAILNGRHTGT PFGDIP
YGKEISYACDTHPDRGMTFN LIGESSIRCTSDPQNGVWSSPAPRCELSVPAACPHPP
KIQNGHYIGGHVSLYLPGMTISYTCDPGYLLVGKGFIFCTDQGIWSQLDHYCKEVNC
SFPLFMNGISKELEMKKVYHYGDYVTLKCEDGYTLEGSPWSQCQADDRWD PPLAK
CTRAHDALIVGTLSGTIFFILLIIFLSWILKHRKGNNAHENPKEVAIHLHSQGGSSVH
PRTLQTNEENSRLP

SEQ ID NO:10 [secuencia de aminoácidos de la proteína de cofactor de membrana humana (MCP)]:
MEPPGRRECPFPSWRFPGLLLAAMVLLLYSFS DACEEPPTFEAMELIGKPKPYEIGE
RVDYKCKKGYFYIPPLATH TICDRNHTWLPVSDDAC YRETCPIYIRDPLNGQAVPANG
TYEFGYQMHFICNEGYYLIGEEILYCELKGSVAIWSGKPPICEKVLCTPPPKIKNGKHT
FSEVEVFEYLD AVTYS CDPAPGDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCRFPV
VENGKQISGFGKKFYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDSNSTWDPPVPKCLKVLPP
SSTKPPALSHSVSTSTTKSPASSASGRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSL DVWVIA
VIVIAIVVGVAVICVVPYRYLQRRKKKGT YLTDETHREVKFTSL

MTVARPSVPAALPLLGLPRLLLLVLLCLPAVWGDCGLPPDVPNAQPALEGRTSFPE
DTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSASLKQPYITQ
NYFPVGTVVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKKSCPNPGEIRNGQI
DVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSDPLPECREIYCPAPPQIDNGI
IQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTVNNDEGEWSGPPPECRGKSLTSKV
PPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTCTTPNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNKGSG
TTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGLVTMGLLT

SEQ ID NO:12 [secuencia de aminoácidos del factor de aceleración del deterioro de ratón (DAF/CD55)]:

MIRGRAPRTRSPPPPLLLSLSLLLLSPTVRGDCGPPDIPNARPILGRHSHKFAEQSK
VAYSCNNGFKQVPDKSNIVVCLENGQWSSHETFCEKSCVAPERLSFASLKKEYLNM
NFFPVGTIVEYECRPGFRKQPPLPGKATCLEDLVWSPVAQFCKKSCPNPKDLNNGH
INIPTGILFGSEIFNSCNPGYRLVGVSSFTCSVTGNTVDWDDEFPVCTEIHCPPEPKINN
GIMRGESDSYYSQVVTYSCDKGFILVGNASIYCTVSKSDVGQWSSPPPRCIEKSKVP
TKKPTINVPSTGTPSTPQKPTTESVNPNGDQPTPQKSTVKVSATQHVPVTKTTVRHPI
RTSTDKGEPTGGDRYIYGHTCLITLTVLHVMLSLIGYLT

5

SEQ ID NO:13 [secuencia de aminoácido de CVF de *Naja kaouthia*]:

MERMALYLVAALLIGFPGSSHGALYTLITPAVLRDTEEQILVEAHGDSTPKQLDIFV
HDFPRKQKTLFQTRVDMNPAGGMLVTPTIEIPAKEVSTDSRQNYVVVQVTGPQVR
LEKVLLSYQSSFLFIQTDKGIYTPGSPVLYRVFSMDHNTSKMNKTIVIVEFQTPEGILV
SSNSVDLNNFFWYNLPDLVSLGTWRIVAKYEHSPENYTA YFDVRKYVLPSEFVRLQP
SEKFFYIDGNENFHVSITARYLYGEEVEGVAFVLFVGVKIDDAKKSIPDSLTRIPIDGDG
KATLKRDTFRSRFPNLNELVGHTLYASVTVMTESGSDMVVTEQSGIHIVASPYQIHFT
KTPKYFKPGMPYELTVYVTNPDGSPA AHVPVSEAFHSMGTTLSDGTAKLILNIPLN
AQSLPITVRTNHGDLPRERQATKSMTAIAIYQTQGGSGNYLHVAITSTEIKPGDNLVFN
FNVKGNANSLKQIKYFTYLILNKGKIFKVGRRDQNLVTMNLHITPDLIPSRFV
AAYQVGNNEIVADSVWVDVKDTCMGTLLVVKGDNLIQMPGAAMKIKLEGDPGARV
GLVAVDKAVYVLNDKYKISQAKIWDTIEKSDFGCTAGSGQNNLGVFEDAGLALTTS
TNLNTKQRSAAKCPQANRRRRSSVLLLDNSASKAAEFQDQDLRCCEDVMHENP
MGYTCEKRAKYIQEGDACKAAFLECCRYIKGVRDENQRESELFLARDDNEDGFIADS
DIISRSDFPKSWLWLTKDLTEEPNSQGISSKTMSFYLRDSITTVVVLAVSFTPTKGICV
AEPYEIRVMKVFFIDLQMPYSVVKNEQVEIRAILHNYVNEDIYVRVELLYNPAFCSAS

TKGQRYRQQFPIKALSSRAVPFVIVPLEQGLHDVEIKASVQEALWSDGVRKKLKVVP
 EGVQKSIVTIVKLDPRAKGVGGTQLEVIKARKLDDRVPDTEIETKIIIQGDPAQIENS
 IDGSKLNHLIITPSGCGEQNMIRMAAPVIATYYLDTTEQWETLGINRRTEAVNQIVTG
 YAQQMVYKKAHDSYAAFTNRASSSWLTAYVVKVFAMAAKMVAGISHEIICGGVR
 WLILNRQQPDGAFKENAPVLSGTMQGGIQGAEEEVYLTAFILVALLESKTICNDYVN
 SLDSSIKKATNYLLKKYEKLRPYTTALTAYALAAADQLNDDRVLMAASTGRDHW
 EEYNAHATHNIEGTSYALLALLKMKKFDQTGPVIRWLTQNFYGETYGGTQATVMAF
 QALAEYEIQMPHDKDLNLDITIELPDREVPYRINYENALLARTVETKLNQDITVTAS
 GDGKATMTILTFYNAQLQEKANVCNKFHNLVSVENIHLNAMGAKGALMLKICTRY
 LGEVDSTMTIIDISMLTGFLPAEDLTRLSKGVDRYISRYEVDNNMAQKVAVIIIYLNK
 VSHSEDECLHFKILKHFEVGFIQPGSVKVSYYNLDEKCTKFYHPDKGTGLLNKICIG
 NVCRCAGETCSSLNHQRIDVPLQIEKACETNVDYVYKTKLLRIEEQDGNDIYVMDV
 LEVIKQGTDENPRAKTHQYISQRKCQEALNLKVNDYLIWGSRSDLLPTKDKISYIIT
 KNTWIERWPHEDECQEEEFQKLCDDFAQFSYTLTEFGCPT

5 SEQ ID NO:14 [secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgG₁ humana, dominio C]:
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO:15 [secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgG₁ ligera, dominio C]:
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID NO:16 [secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgG₁ humana]:
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTPPVLDSDGPFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

10 SEQ ID NO:17 [secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgM humana, dominio C]:
 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
 LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
 FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESG
 PTTYKVTSTLTIKESDWLQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVDPQDPAIRVFAIPPS
 FASIFLTKSTKLTVLTDLTYDSVTISWTRQNGEAVKHTNISESHPNATFSAVGEAS
 ICEDDWSNGERFTCTVTHDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
 TITCLVTGFSPADVFVQWQMRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
 WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

15 SEQ ID NO:18 [secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de IgM humana, dominio C]:

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVA VGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPV

SEQ ID NO:19 [secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgM humana]:

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVA VGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSV
LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
FVPPRDGFFGNPRSKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKES
GPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPP
SFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKHTNISESHPNATFSAVGEA
SICEDDWNSGERFTCTVTHDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRES
ATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE

5 WNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

SEQ ID NO:20 [secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgG₃ de ratón]:

TTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVRTVSSVLQ
SGFYSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIKRIEPRIPKPSPPGSSCPPGNILG
GPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQPRE
AQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYT
IPPREQMSKKKVSILTCLVTNFFSEAISVEWERNGELEQDYKNTPPILDSGTYFLYS
KLTVDTDSWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSP

10

SEQ ID NO:21 [secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de IgG₃ de ratón]:

IVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSVRSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGV
PVRFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYDSSPSITFGAGTKLELK

SEQ ID NO:22 [secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgG₃ de ratón]:

EPRIPKPSPPGSSCPPGNILGGPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVH
VSWFVDNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALP
APIERTISKPKGRAQTPQVYTIPPREQMSKKKVSILTCLVTNFFSEAISVEWERNGELE
QDYKNTPPILDSGTYFLYSKLTVDTDSWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSP

15

GK

SEQ ID NO:23 [secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgM de ratón, dominio C]:

SQSFPNVFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGIPTFPTL
RTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHGGKNRDLHVPPIVAEMNPVNVF
VPPRDGFSGPAPRKS KLICEATNFTP KPITVSWLKDGLVESGFTTDPVTIENKGSTPQ
TYKVISTLTISEIDWLNLVYTCRVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTDILTFTIPPSFADIF
LSKSANLTCLVSNLATYETLNISWASQSGEPLETKIKIMESHPNGTFSKGVASVCVE
DWNNRKEFVCTVTHRDLPSQKKFISKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVT
CLVKGFS PADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTHSILTVTEEEWNS
GETYTCVVGHEALPHLVTERTVDKSTGKPTLYNVSLIMSDTGGTCY

20 SEQ ID NO:24 [secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de IgM de ratón, dominio C]:

ES 2 717 912 T3

SQSFPNVFPLVSCESPLSDKNLVAMGCLARDFLPSTISFTWNYQNNTEVIQGITFPTL
RTGGKYLATSQVLLSPKSILEGSDEYLVCKIHYGGKNRDLHVPIIP

SEQ ID NO:25 [secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgM de ratón]:

5 ASPSTDILTFTIPPSFADIFLSKSNLTLCLVSNLATYETLNISWASQSGEPLETKIKIMES
HPNGTFSAKGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDLPSPQKKFISKPNEVHKHPPAVY
LLPPAREQLNLRESATVTCLVKGFSPADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAP
GFYFTHSILTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERTVDKSTGKPTLYNVSLIMS
DTGGTCY

SEQ ID NO:26 [secuencia enlazadora entre los primeros dos dominios de repetición de consenso de corto de extremo N de CR2 humano]:

10 VSVFPLE

SEQ ID NO:27 [secuencia enlazadora entre los primeros dos dominios de repetición de consenso de corto de extremo N de CR2 humano]:

15 EYFNKYSS

SEQ ID NO:28 [secuencia enlazadora entre el cuarto y el quinto dominio de repetición de consenso corto de extremo N de CR2 humano]:

20 EEIF

REIVINDICACIONES

1. Una composición soluble capaz de la administración dirigida de un modulador del complemento a sitios de activación del sistema del complemento que comprenden una construcción, donde la construcción comprende:
- 5 (a) una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de dicha construcción que comprende al menos los dos primeros dominios de repeticiones de consenso cortas de extremo N (SCR) de la proteína CR2; y
 (b) una parte del modulador del complemento de dicha construcción;
- 10 donde la parte de CR2 contiene al menos una sustitución de aminoácidos que disminuye la afinidad de unión de la parte de CR2 para EBV gp350 con respecto a una construcción en la cual la parte de CR2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 y donde la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en N11 o Y64 de SEQ ID NO: 2.
- 15 2. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 1, donde la parte de CR2 comprende al menos los tres primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2 humana, más específicamente donde la parte de CR2 comprende al menos los cuatro primeros dominios de SCR de extremo N de la proteína CR2 humana, incluso más específicamente donde la parte de CR2 comprende la CR2 humana de longitud completa.
- 20 3. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 1, donde la parte del modulador del complemento comprende un inhibidor del complemento.
4. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 3, donde el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en: factor H humano conforme a SEQ ID NO: 5, factor H de ratón conforme a SEQ
 25 ID NO: 8, un anticuerpo de componente anticomplemento 5 (C5) o fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo antifactor B o fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo antifactor D o fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-properdina o fragmento de unión al antígeno de este, proteína del complemento de membrana humana (MCP) conforme a SEQ ID NO: 10, factor de aceleración del deterioro humano (DAF) conforme a SEQ ID NO: 11, DAF de ratón conforme a SEQ ID NO: 12, gen/proteína y relacionado con el receptor del
 30 complemento de ratón 1 (Crry) conforme a SEQ ID NO: 4, CD59 humana conforme a SEQ ID NO: 3, isoforma A de CD59 de ratón conforme a SEQ ID NO: 6, isoforma B de CD59 de ratón conforme a SEQ ID NO: 7, o receptor del complemento humano 1 (CR1) conforme a SEQ ID NO: 9.
5. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 4,
- 35 (a) donde el inhibidor del complemento comprende factor H humano conforme a SEQ ID NO: 5;
 (b) donde el inhibidor del complemento comprende factor H de ratón conforme a SEQ ID NO: 8;
 (c) donde el inhibidor del complemento comprende proteína del complemento de membrana humana (MCP) conforme a SEQ ID NO: 10;
 40 (d) donde el inhibidor del complemento comprende DAF humano conforme a SEQ ID NO: 11;
 (e) donde el inhibidor del complemento comprende DAF de ratón conforme a SEQ ID NO: 12;
 (f) donde el inhibidor del complemento comprende Crry conforme a SEQ ID NO: 4;
 (g) donde el inhibidor del complemento comprende CD59 humana conforme a SEQ ID NO: 3;
 (h) donde el inhibidor del complemento comprende isoforma A de CD59 de ratón conforme a SEQ ID NO: 6;
 45 (i) donde el inhibidor del complemento comprende isoforma B de CD59 de ratón conforme a SEQ ID NO: 7; o
 (j) donde el inhibidor del complemento comprende CR1 humano conforme a SEQ ID NO: 9.
6. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la parte del modulador del complemento comprende un activador del complemento.
- 50 7. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 6, donde el activador del complemento se selecciona del grupo que consiste en IgG₁ humana, dominio Fc de IgG₁ humana, IgM humana, dominio Fc de IgM humana, IgG₃ de ratón, dominio Fc de IgG₃ de ratón, IgM de ratón, dominio Fc de IgM de ratón y factor de veneno de cobra (CVF).
- 55 8. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 1, donde la construcción presenta afinidad de unión disminuida para IFN α en comparación con una construcción en la cual la parte de CR2 no contiene ninguna sustitución de aminoácidos.
- 60 9. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 8, donde la parte de CR2 además comprende al menos una sustitución de aminoácidos que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en: S42 y K50 de SEQ ID NO:2.
10. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 8, donde la construcción presenta afinidad de
 65 unión disminuida para fragmentos proteolíticos de C3 en comparación con una construcción en la cual la parte de CR2 no contiene ninguna sustitución de aminoácidos.

11. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 10, donde la parte de CR2 además comprende al menos una sustitución de aminoácidos que se produce en una posición seleccionada del grupo que consiste en: I9, Y29, C31, G33, T34, D56, S70, H90, D92, S93, A97, T100, N101, S109 y S128 de SEQ ID NO:2.
- 5 12. La composición soluble de acuerdo con la reivindicación 10, donde el al menos un fragmento proteolítico de C3 se selecciona del grupo que consiste en: C3d, iC3dg, C3dg y un fragmento unido a células de C3b que se une a CR2.
- 10 13. La composición soluble de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, donde la al menos una sustitución de aminoácidos en la parte de CR2 de la construcción es una sustitución para el aminoácido alanina.
14. La composición soluble de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 13, donde la construcción es una proteína de fusión con o sin un enlazador.
- 15 15. La composición soluble de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 14 formulada para administración intravenosa, intraperitoneal, inyección intraocular o administración oral.
16. La composición soluble de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 15 para su uso en el
20 tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en asma, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis reactiva, espondil artritis, vasculitis sistémica, diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Sjögren, enfermedad de injerto versus huésped, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lesión por isquemia de reperfusión, infarto de miocardio, mal de Alzheimer, rechazo de trasplante alogénico, rechazo de trasplante xenogénico, trauma termal,
25 una inflamación inducida por complejo inmunológico, glomerulonefritis, miastenia grave, lupus cerebral, síndrome de Guillain-Barré, vasculitis, esclerosis sistémica, anafilaxis, reacciones del catéter, ateroma, infertilidad, tiroiditis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), síndrome post derivación, hemodiálisis, reumatoide juvenil, síndrome de Behçet, anemia hemolítica, pénfigo, penfigoide buloso, apoplejía, aterosclerosis, esclerodermia, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus sincitial respiratorio, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del
30 Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre de Lassa, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis japonesa, virus de la Encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis del valle del Murray, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre del valle del Rift, rotavirus A, rotavirus B, rotavirus C, virus de Sindbis y hantavirus.
17. Un procedimiento para realizar una construcción que se une selectivamente a uno o más fragmentos
35 proteolíticos de C3, pero no se une selectivamente a EBV gp350, donde el procedimiento comprende mutar uno o más aminoácidos en una parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción en una posición seleccionada del grupo que consiste en: N11 y Y64 de SEQ ID NO:2 donde la construcción comprende:
- (i) una parte de receptor del complemento 2 (CR2) que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR de
40 extremo N de la proteína CR2; y
- (ii) una parte de modulador del complemento.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, donde la o las mutaciones en la parte del receptor
45 del complemento 2 (CR2) de la construcción son mutaciones al aminoácido alanina.
19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, donde el procedimiento además comprende mutar uno o más aminoácidos en la parte del receptor del complemento 2 (CR2) de la construcción en una posición
50 seleccionada del grupo que consiste en: R13, Y16, A22, R28, S32, R36, K41, K48, K57, K67, Y68, R83, G84 y R89 de SEQ ID NO:2.
20. Un procedimiento para reducir la afinidad de unión de una construcción para EBV-gp350, donde la construcción comprende:
- 55 (a) una parte de CR2 que comprende al menos los dos primeros dominios de SCR cortas de extremo N de CR2; y
(b) una parte del modulador del complemento,
donde dicho procedimiento comprende mutar al menos un residuo de aminoácido de la parte de CR2 seleccionada del grupo que consiste en N11, y Y64 de SEQ ID NO:2.

Figura 1.

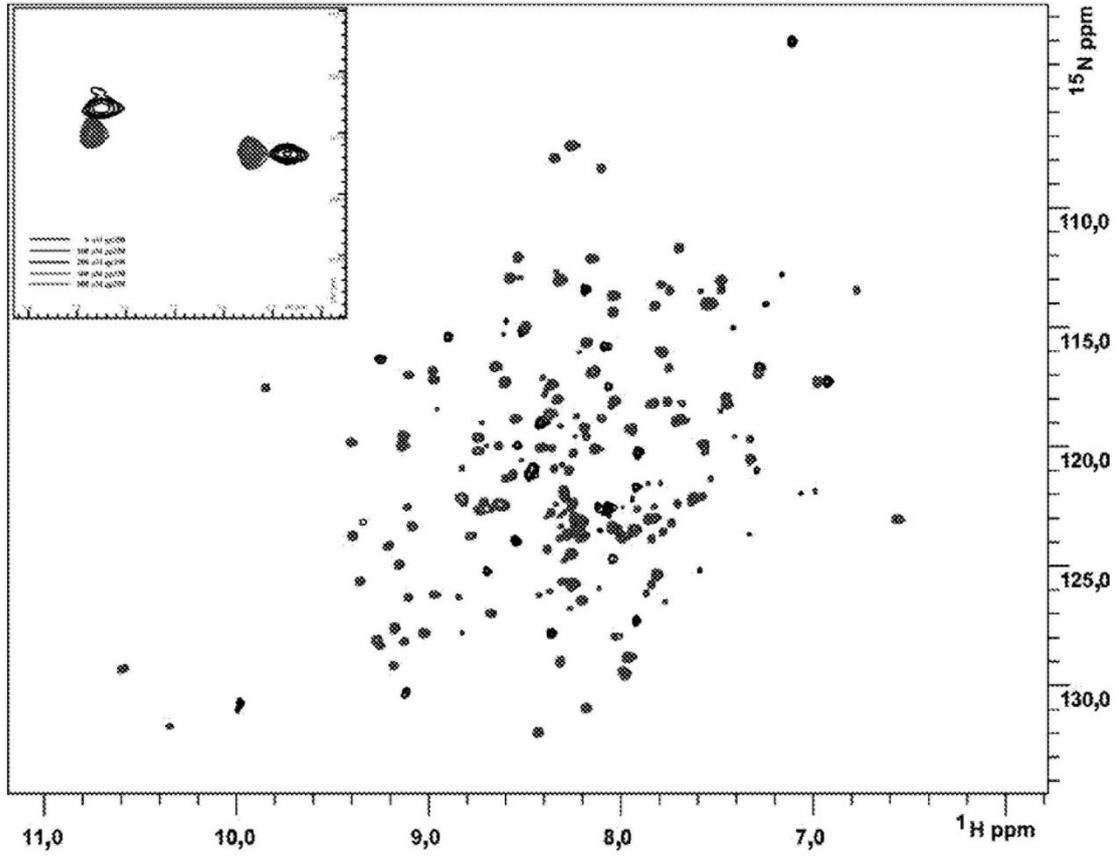


Figura 2.

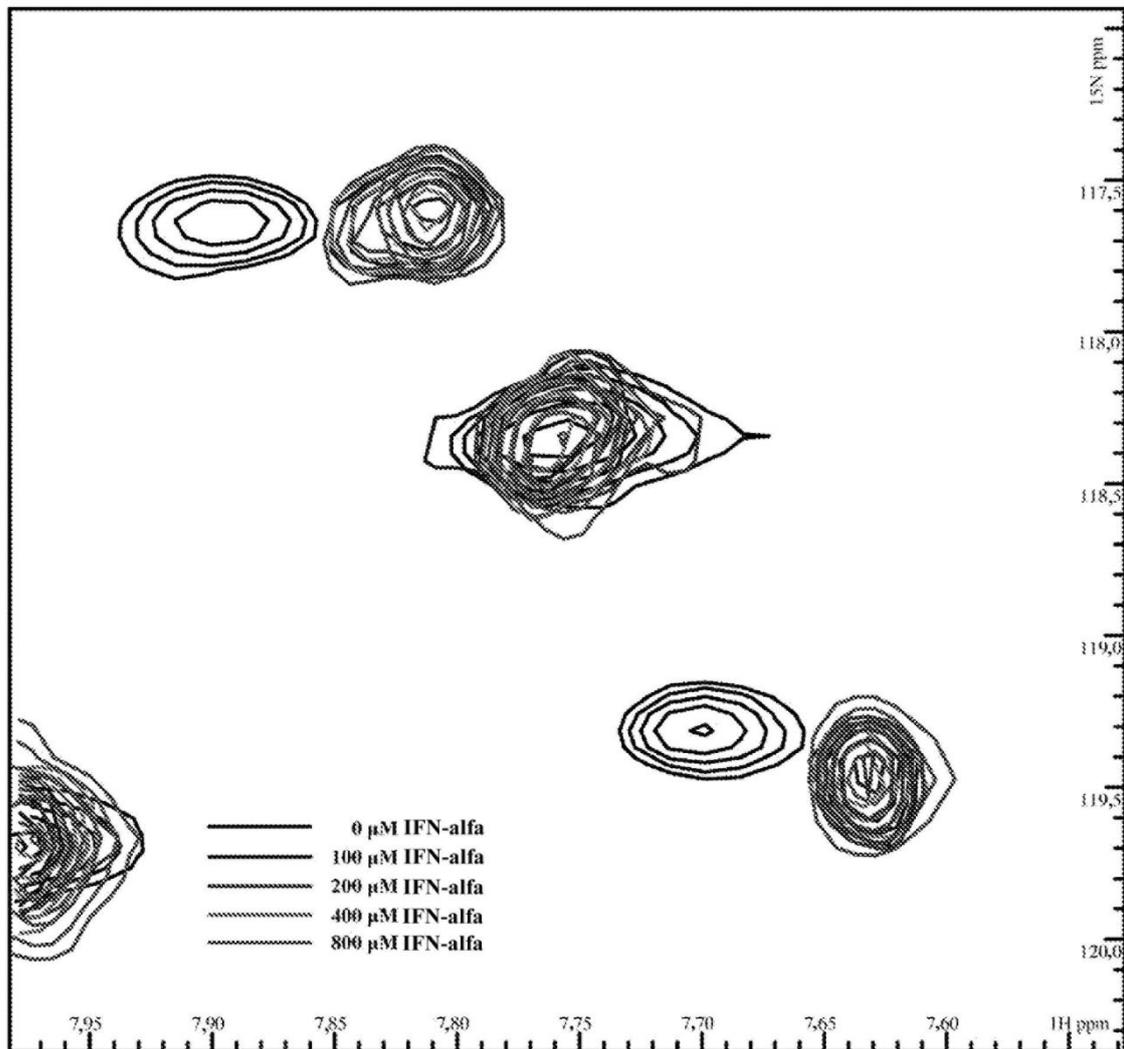


Figura 3.

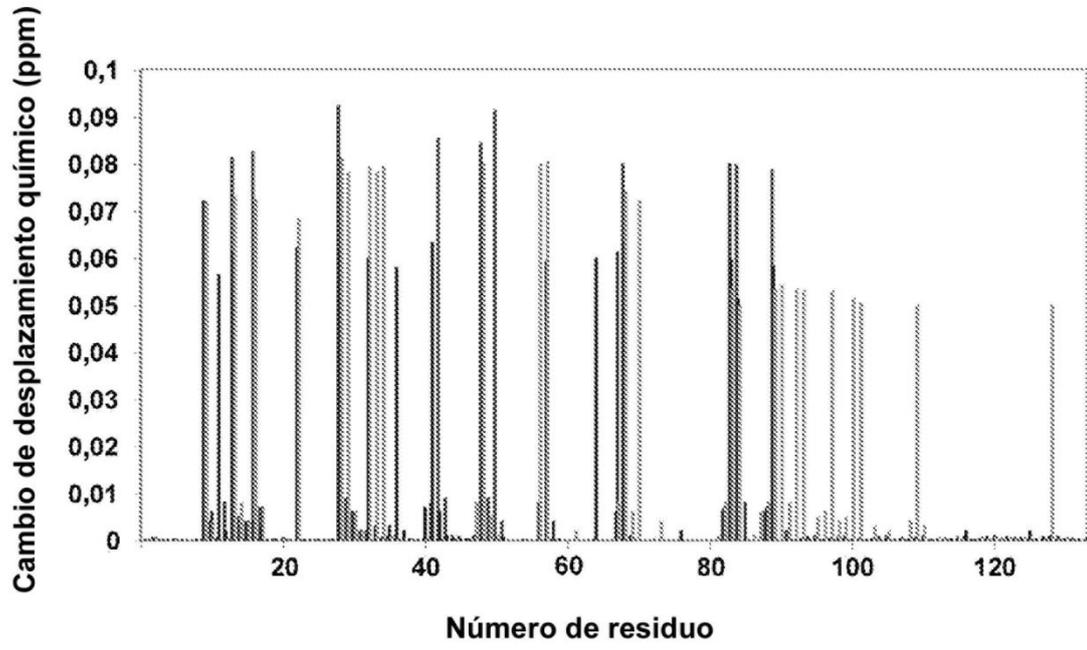


Tabla 1.

Ligando de CR2	Determinado por NMR K_d (μM)	Determinado por ITC K_d (μM)
C3d	Fuerte, UL 45	$0,13 \pm 0,05$
	Débil 130 ± 60	160 ± 20
gp350	UL, 60	$0,014 \pm 0,009$
IFN- α	UL, 70	$0,036 \pm 0,008$

Tabla 2.

CR2-C3d	CR2-gp350	CR2-IFNα
I9*		
	N11*	
R13	R13	R13
Y16		Y16
A22	A22	
R28	R28	R28
Y29*		
C31*		
S32	S32	
G33*		
T34*		
	R36*	
	K41*	
		S42*
K48		K48
		K50*
D56*		
K57	K57	
	Y64*	
	K67*	
Y68	Y68	Y68
S70*		
R83	R83	R83
G84	G84	G84
R89	R89	R89
H90*		
D92*		
S93*		
A97*		
T100*		
N101*		
S109*		
S128*		