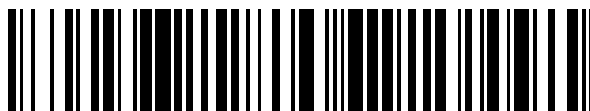


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 628**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/US2012/036459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12779642 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2704744**

54 Título: **Análogos del factor B del complemento y sus usos**

30 Prioridad:

**05.05.2011 US 201161482827 P**  
**16.06.2011 US 201161497835 P**  
**08.12.2011 US 201161568518 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.01.2020**

73 Titular/es:

**WELLSTAT IMMUNOTHERAPEUTICS, LLC**  
**(100.0%)**  
**14200 Shady Grove Road, Suite 600**  
**Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, CHANGHUNG;**  
**KALEKO, MICHAEL;**  
**LI, BEIBEI;**  
**LUO, TIANCI;**  
**MILLER, JEFFREY, ALLEN y**  
**WANG, RUIGONG**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**ES 2 738 628 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

Análogos del factor B del complemento y sus usos

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema del complemento es un componente del sistema inmune innato y adaptable (revisado por Volanakis, J.E., 1998. Capítulo 2. In *The Human Complement System in Health and Disease*. Editada por J. E. Volanakis y M.M. Frank. Marcel Dekker, Inc., Nueva York páginas 9-32). El complemento desempeña un papel importante en el exterminio de microbios, y para el transporte y depuración de complejos inmunes. Muchos de los productos de activación del sistema del complemento también están asociados con funciones pro-inflamatorias o inmunorreguladoras. El sistema del complemento consiste de proteínas asociadas con el plasma y las membranas que se organizan en tres cascadas de activación enzimática: las vías clásica, de lectina y alternativa (Figuras 1A-1B). Las tres vías pueden conducir a la formación del complejo de complemento terminal (TCC, por sus siglas en inglés) y una serie de productos biológicamente activos.

En algunos casos, la activación del complemento es iniciada ya sea por anticuerpos específicos que reconocen y se unen a una variedad de agentes patógenos o moléculas extrañas y/o por la interacción directa de proteínas del complemento con sustancias extrañas. Con la activación, estas vías dan por resultado la formación de complejos de proteasa, las C3-convertasas. La vía clásica C3-convertasa, C4b2a, y la vía alternativa C3-convertasa, C3bBb, son capaces ambas de escindir la cadena  $\alpha$  de la C3 que genera C3b. La C3b tiene el potencial de enlazarse covalentemente a superficies biológicas. La unión de C3b conduce a la opsonización para la fagocitosis mediante células polimorfonucleares y macrófagos. Cuando la C3b adicional está disponible, las C3-convertasas pueden funcionar como C5-convertasas, escindiendo la C5 e iniciando el ensamble del TCC, o el complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés), el cual media la lisis celular mediante la inserción de complejos de proteínas formadores de poros en las membranas celulares fijadas como objetivo.

En la vía clásica mostrada en la Figura 1A, el C1q, un subcomponente de colágeno del primer componente (C1), se une a inmunoglobulinas dentro de complejos inmunes y sus serina proteasas asociadas, C1r y C1s, se activan. Esta cascada de complementos es iniciada por la escisión subsecuente de C4 y C2, seguido por la activación de C3. El fragmento de C3b resultante no solo actúa como una opsonina sino que también conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la vía lítica. En la inmunidad innata, un complejo compuesto de una molécula de reconocimiento (lectina) y serina proteasas, denominadas las serina proteasas (MASP, por sus siglas en inglés) asociadas con lectina de unión a manosa (MBL), activa C4 y C2 con la unión a carbohidratos sobre la superficie de microorganismos por medio de la vía de lectina. Esta unión ocurre en ausencia de inmunoglobulinas. Las moléculas de reconocimiento de la vía de lectina encontrada en vertebrados provistos de mandíbulas son MBLs y ficolinas, las cuales se caracterizan ambas por la presencia de un dominio similar al colágeno, como C1q, y un dominio de unión a carbohidratos que tiene una especificidad de unión común por GlcNAc. Las MASPs y los C1r/C1s comparten la misma organización de dominios y forman una subfamilia de serina proteasas.

La vía del complemento de lectina en la inmunidad innata está relacionada estrechamente con la vía del complemento clásica en la inmunidad adaptable, por ejemplo, con respecto a las estructuras y funciones de sus componentes. Ambas vías son iniciadas habitualmente por complejos que consisten de proteínas de colágeno y serina proteasas de la familia de serina proteasa (MASP) asociada con lectina de unión a manosa (MBL)/C1r/C1s. Se ha especulado que la vía clásica surgió evolutivamente después de la vía de lectina.

La activación de la vía alternativa del complemento, mostrada en la Figura 1B, comienza habitualmente cuando la proteína de C3b (o C3i) se une a una célula y otros componentes superficiales, por ejemplo, de microbios. C3b también se puede enlazar a anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG). La proteína del Factor B de la vía alternativa entonces se combina con la proteína de C3b para formar C3bB. La proteína del Factor D entonces divide la proteína del Factor B unida en los fragmentos Bb y Ba, formando C3bBb. La properdina entonces se une a Bb para formar C3bBbP que funciona como una C3-convertasa capaz de dividir de manera enzimática habitualmente cientos de moléculas de C3 en C3a y C3b. Algunos de los C3b se unen subsecuentemente a algunos de los C3bBb para formar C3bBbC3b, una C5-convertasa capaz de dividir moléculas de C5 en C5a y C5b.

Dado que C3b está libre en el plasma, se puede enlazar a ya sea una célula hospedante o una superficie de patógeno. Para impedir que la activación del complemento proceda en la célula hospedante, existen varias clases diferentes de proteínas reguladoras que interrumpen el proceso de activación del complemento. El Receptor del Complemento 1 (CR1 o CD35) y DAF (también conocido como CD55) compiten con el Factor B en la unión con C3b sobre la superficie celular e incluso pueden retirar el Bb de un complejo de C3bBb ya formado. La formación de una C3-convertasa también se puede impedir cuando un plasma proteasa llamado Factor I escinde el C3b en su forma inactiva, iC3b. El Factor I

funciona con cofactores de proteínas de unión a C3b tales como CR1 y Cofactor de Proteólisis de Membrana (MCP o CD46). Otra proteína reguladora del complemento es el Factor H el cual ya sea compite con el factor B, desplaza el Bb de la convertasa, actúa como un cofactor para el Factor I, o se une preferentemente a C3b unido a células de vertebrados.

5 La función precisa del sistema del complemento depende de su regulación, ya que la activación de la cascada del complemento conduce a la producción de una variedad de proteínas que contribuyen a la inflamación. Esto es benéfico cuando contribuyen a la defensa de un hospedante, pero puede ser perjudicial si se activan en el tejido mismo. Habitualmente, la activación de C3 en la sangre se mantiene a un nivel bajo y la deposición de C3b está limitada a la superficie de agentes patógenos.

10 La proteína del factor B del complemento de tipo salvaje humana es una glicoproteína de cadena individual de 764 aminoácidos (aproximadamente 93 kDa) compuesta de cinco dominios de proteína (Mole *et al.*, 1984 The J. Biol. Chem., 259:6, 3407-3412). La proteína del factor B del complemento de tipo salvaje humana (fB) es expresada habitualmente con un péptido de señal de 25 aminoácidos N-terminal, por ejemplo, véase la SEQ ID NO: 1. La región amino-terminal (Ba) de la proteína del factor B del complemento de tipo salvaje humana consiste principalmente de tres repeticiones consensuales cortas. La región intermedia es un dominio tipo A similar a aquellos encontrados en el factor de von Willebrand (Colombatti *et al.*, Blood (1991) 77(11):2305-15). La terminación carboxi es un dominio de serina proteasa (SP, por sus siglas en inglés) (Perkins y Smith, Biochem J. (1993) 295(Pt 1):109-14; Hourcade *et al.*, JBC (1998) 273(40):25996-6000; Hourcade *et al.* J Immunol. (1999) 162(5):2906-11; Xu *et al.*, J Biol Chem. 2000 275(1):378-85; Milder *et al.* Nat Struct Mol Biol (2007) 14(3):224-8).

25 Los análogos del factor B del complemento y su uso para inhibir el complemento y para tratar enfermedades mediadas por el complemento se describen en la Publicación del PCT No. WO08/106644 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665. Por ejemplo, el análogo de la proteína del factor B del complemento humano, hfB3 (descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20100120665), es una variante de la proteína del factor B humana, negativa, dominante que inhibe eficientemente la actividad alternativa del complemento (AP). La proteína hfB3 (SEQ ID NO: 4) tiene cinco cambios de aminoácidos en comparación con una proteína del factor B de tipo salvaje humana (SEQ ID NO: 1). Los cinco cambios de aminoácidos hacen posible que la proteína hfB3 (i) se una mucho más estrechamente a la proteína C3b, (ii) resista la escisión dependiente de C3b por la proteína del factor D y (iii) se una más estrechamente a la proteína del factor D en comparación con la proteína del factor B de tipo salvaje. La unión más estrecha de la proteína hfB3 con la proteína C3b y la proteína del factor D secuestra dos componentes esenciales de la vía alternativa del complemento (ACP, por sus siglas en inglés) en la C3 convertasa inactiva (hfB3), bloqueando la actividad de AP. Puesto que la proteína hfB3 unida a C3b no puede ser escindida por la proteína del factor D, el cambio conformacional de la proteína hfB3 no ocurre y la serina proteasa en la terminación C de la proteína hfB3 no es activada.

35 Lesavre P. *et al.* Eur. J. Immunol. (1982) 12: 252-254 menciona hexapéptidos que mimetizan la secuencia de aminoácidos parcial del factor B que rodea el enlace que es escindido por el factor D.

40 Tanto la proteína del factor B del complemento de tipo salvaje humana como la hfB3 contienen 23 aminoácidos de cisteína. Las formas "activas" de ambas tienen todas las cisteínas que forman los enlaces de disulfuro con una de las otras cisteínas, con la excepción de la cisteína que corresponde a la C292 de la SEQ ID NO: 1. La C292 de las "formas activas" de hfB3 y el factor B de tipo salvaje es una cisteína libre (Parkes *et al.*, 1983 Biochem J. 213, 201-209) y está sumamente conservada entre varias especies de mamíferos, por ejemplo, véase la Tabla 1, posteriormente.

45 La mención o planteamiento de una referencia en este documento no debe interpretarse como una admisión de que ésta es la técnica anterior para la presente invención.

**CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

50 La invención se define según las reivindicaciones. De este modo, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un análogo de proteína del factor B del complemento, en el que  
 (A) el análogo del factor B del complemento comprende una sustitución de un aminoácido de cisteína libre;  
 (B) la cisteína libre corresponde al aminoácido 292 de la SEQ ID NO: 1, tal como se determina mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos del análogo del factor B del complemento con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;  
 (C) el análogo de la proteína del factor B del complemento humano es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 26-764 de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; a los aminoácidos 26-990 de las SEQ ID NOs: 22 o 23; a los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o a los aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26; y

(D) dicho análogo de la proteína del factor B del complemento ha aumentado la afinidad de unión a C3b, en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa correspondiente codificada por un genoma de mamífero, y dicho análogo de la proteína del factor B del complemento

5 (i) tiene una actividad de proteasa disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa;

(ii) tiene una capacidad de ser escindido por la proteína del factor D disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa; o

10 (iii) tiene una actividad de proteasa disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa y tiene una capacidad de ser escindido por una proteína del factor D disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa; o

(iv) puede competir con un factor B nativo por la unión al factor D.

15 En una realización, la cisteína libre está sustituida por más de un aminoácido. En una realización, el análogo de la proteína del factor B del complemento es un análogo de la SEQ ID NO: 4 y el análogo de la proteína del factor B del complemento tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces disulfuro y un aminoácido de cisteína libre ha sido sustituido por otro aminoácido. En una realización, la cisteína libre está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina. En una realización, el que el análogo de la proteína del factor B del complemento es un análogo de la proteína del factor B del complemento humano. En una realización, el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende mutaciones que corresponden a K258A, R259A, K260A, D279G y N285D de la SEQ ID NO: 1, tal como se determina mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos del análogo del factor B del complemento con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o el análogo de la proteína del factor B del complemento no comprende los aminoácidos 481-764 de la SEQ ID NO: 2. En una realización, el análogo de la proteína del factor B del complemento humano es al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a los aminoácidos 26-764 de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; a los aminoácidos 26-990 de las SEQ ID NOs: 22 o 23; a los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o a los aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26. En una realización, el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende la SEQ ID NO: 2, 3, 22, 23, 26, o los aminoácidos 1-480 de la SEQ ID NO: 2; o el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23, o los aminoácidos 26-1009 de la SEQ ID NO: 26; o el análogo de la proteína del factor B del complemento consiste esencialmente en los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23 o los aminoácidos 26-1009 de la SEQ ID NO: 26. En una realización, el polipéptido comprende un dominio Fc de inmunoglobulina; preferiblemente en el que el dominio Fc está C-terminal al análogo del factor B del complemento.

40 La presente invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención.

45 La presente invención también proporciona un vector viral que comprende el ácido nucleico de la invención; preferiblemente en el que dicho vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector viral del herpes, un vector viral de la hepatitis, un vector viral de SV40, un vector de VAA, un vector de VEB y un vector de VEN; preferiblemente en el que dicho vector lentiviral es un vector VIB, VIH, VAIE, VIS o VIF.

La invención también proporciona una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector viral de la invención o cualquier combinación de los mismos.

50 La invención también proporciona un polipéptido de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector viral de la invención, una preparación farmacéutica de la invención o cualquier combinación de los mismos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad medida por complemento en un paciente, en el que el polipéptido inhibe la actividad del complemento; preferiblemente en el que la enfermedad mediada por el complemento se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedades relacionadas con el sistema inmune, enfermedades relacionadas con la autoinmunidad, lupus nefritis, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis, enfermedades reumatológicas, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, lesión intestinal y renal posterior a la I/R, asma, síndrome hemolítico-urémico atípico, glomerulonefritis membranoproliferativa Tipo II, glomerulonefritis no proliferativa, pérdida del feto, lesión cerebral, daño postraumático de órganos, daño postinfarto de órganos, vasculitis, angioedema hereditario, hemoglobinuria paroxística nocturna, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, rechazo de trasplante, infecciones, sepsis, choque séptico, síndrome de Sjögren, miastenia grave, enfermedades de la piel mediadas por anticuerpos, diabetes mellitus Tipo I y Tipo II, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes gestacional,

5 tiroiditis, púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica, neuropatías, esclerosis múltiple, lesión de derivación  
cardiopulmonar, poliarteritis nodosa, púrpura de Henoch Schonlein, enfermedad del suero, enfermedad de Goodpasture,  
vasculitis necrotizante sistémica, glomerulonefritis posestreptocócica, fibrosis pulmonar idiopática, glomerulonefritis  
membranosa, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de dificultad respiratoria en adultos y reperfusión,  
10 preferiblemente en el que la enfermedad mediada por el complemento es una enfermedad del ojo, tal como  
degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), atrofia geográfica, AMD húmeda, infarto  
de miocardio, AMD seca, formación de drusas, artritis, apoplejía, lesión por reperfusión isquémica, retinopatía diabética,  
vitreo-retinopatía, lesión traumática de órganos, inflamación de la córnea, neovascularización de la córnea, uveítis,  
15 hipertensión ocular o glaucoma; preferiblemente en el que la composición farmacéutica se administra al ojo;  
preferiblemente en el que la composición farmacéutica se administra mediante inyección intravítrea, inyección subretinal,  
inyección a la cámara de intraanterior del ojo, inyección o aplicación localmente a la córnea, inyección subconjuntival,  
inyección subtenoniana, o mediante gotas para los ojos.

15 La invención también proporciona una célula que comprende el ácido nucleico de la invención, en la que la célula  
expresa el polipéptido; preferiblemente en la que la célula es una célula de mamífero; preferiblemente en el que la célula  
se selecciona del grupo que consiste en una célula 293, una célula CHO, una célula PerC6 o una célula Vero.

20 Tal como se describe aquí, la invención proporciona polipéptidos que comprenden un análogo del factor B del  
complemento. La invención también proporciona varios análogos del factor B del complemento. En algunas  
realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende una mutación de un aminoácido de cisteína libre. La  
invención también proporciona ácidos nucleicos y vectores virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que  
25 codifica polipéptidos y análogos de la proteína del factor B del complemento de la invención. Algunas realizaciones de la  
invención proporcionan células, en donde las células comprenden un ácido nucleico que codifica un análogo de la  
proteína del factor B del complemento de la invención y en donde las células expresan un análogo de la proteína del  
factor B del complemento.

30 Adicionalmente, la invención proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido o análogo de la  
proteína del factor B del complemento de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector viral de la invención o  
cualquier combinación de los mismos.

35 La presente invención también proporciona procedimientos para tratar una enfermedad mediada por el complemento que  
comprenden administrar a un paciente una preparación farmacéutica de la invención, un polipéptido de la invención, un  
análogo de la proteína del factor B del complemento de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector viral de  
la invención o cualquier combinación de los mismos.

La invención también proporciona procedimientos para producir un polipéptido que comprende un análogo de la proteína  
del factor B del complemento, el procedimiento comprende: expresar en una célula un análogo de la proteína del factor B  
del complemento de la invención y purificar el análogo de la proteína del factor B del complemento.

40 Los polipéptidos de la invención, los análogos del factor B del complemento de la invención y los ácidos nucleicos y  
vectores que los codifican, se pueden utilizar para modular una vía del complemento y para el estudio y/o tratamiento de  
varias afecciones o enfermedades relacionadas con una vía del complemento.

45 La invención se basa en descubrimientos respecto a que la mutación o eliminación de una cisteína libre (i) mejora el  
rendimiento de un análogo de la proteína del factor B del complemento activo y/o apropiadamente doblado (por ejemplo,  
véase los Ejemplos 9 y 10); (ii) mejora la termoestabilidad de un análogo de la proteína del factor B del complemento  
(por ejemplo, véase los Ejemplos 13 y 14); y/o (iii) reduce la agregación de un análogo de la proteína del factor B del  
complemento (por ejemplo, véase el Ejemplo 6).

50 Estas características de la invención no describen necesariamente todas las características o características necesarias  
de la invención. La invención también puede residir en una subcombinación de las características descritas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 Con el propósito de ilustrar la invención, en los dibujos se representan ciertas realizaciones de la invención. Sin  
embargo, la invención no está limitada a las ordenaciones e instrumentos precisos de las realizaciones representadas en  
los dibujos.

60 La Figura 1A representa las vías del complemento clásica y de lectina. La vía clásica se inicia a través de C1 mientras  
que la vía de lectina se inicia a través de lectina de unión a manosa (MBL). La C4bC2a es una proteasa que escinde de  
C3 a C3a y C3b y se denomina la C3 convertasa. Similarmente, la C4bC2aC3b escinde de C5 a C5a y C5b y se

denomina la C5 convertasa. El C3a, el C4a y el C5a tienen propiedades inflamatorias y atraen células fagocíticas. La C5b6-9 forma el complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual crea poros en la membrana que aniquilan agentes infecciosos pero también pueden dañar las células hospedantes. La MASP es la serina proteasa asociada con lectina de unión a manano.

5 La Figura 1B representa la vía alternativa del complemento. Esta vía se activa constitutivamente a un bajo nivel a través de la escisión espontánea de C3. En presencia de una superficie apropiada, el C3b se une al factor B del complemento (fB). Este complejo a continuación es escindido por el factor D del complemento (fD) para producir el C3bBb. La disociación espontánea ("descomposición") de este complejo dentro de minutos conduce a su inactivación, mientras que la estabilización mediante properdina genera un complejo que escinde el C3; es decir, una C3 convertasa. Varios de los factores que atenúan las vías del complemento lo hacen al acelerar la descomposición de las C3 y C5 convertasas. El C3b participa en la C3 convertasa para generar C3b adicional creando de ese modo un bucle de retroalimentación positivo que es mostrado por la flecha grande. El C3bBb es una C3 convertasa. El C3bBbC3b es una C5 convertasa.

10 La Figura 2 es una construcción de expresión de hfB3-292S. CMV-promotor temprano inmediato de citomegalovirus; IRES-sitio de entrada ribosómica interno; Neo-gen de neomicina fosfotransferasa; SynPolyA-poliA sintético; Amp-gen resistente a Ampicilina. La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de la construcción de expresión hfB3-292S mostrada en la Figura 2.

15 La Figura 3 muestra el análisis de inmunotransferencia Western de sobrenadantes de cultivo de células sin procesar que contienen la proteína ya sea hfB3 o hfB3-292S después de la incubación de cultivo de células durante 72 horas ( $2 \times 10^6$  células/ml). Carril 1, un  $\mu$ l de medio de cultivo de células de células 293 FreeStyle no transfectadas naturales sirvió como un control negativo; Carril 2, cien ng de factor B de tipo salvaje humano (Quidel, Santa Clara, CA) purificado de plasma sirvieron como un control positivo; Carril 3, un  $\mu$ l de medio de cultivo de células que producían hfB3; Carril 4, un  $\mu$ l de medio de cultivo de células que producían hfB3-292S. Los marcadores de peso molecular en kDa se indican a la derecha.

20 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo hemolítico. Estos resultados demuestran la inhibición de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humana por el medio de cultivo de células que producía la proteína hfB3 o la proteína hfB3-292S sin procesar. La actividad hemolítica relativa se califica por la hemoglobina liberada después de hemólisis de rRBCs por la actividad de la vía alternativa del complemento humana. Eje X de izquierda a derecha: suero humano agotado del factor B complementado con 0  $\mu$ g de proteína del factor B humana, purificada (control, sin lisis de rRBCs); suero humano agotado de factor B complementado en cada reacción con una mezcla de 0,5  $\mu$ g de proteína del factor B humana, purificada y 1,0, 0,5, 0,25 o 0,125  $\mu$ g de proteína hfB3 o proteína hfB3-292S, como se indica, del medio de cultivo de células que producían la proteína hfB3 o la proteína hfB3-292S. Nota: 100% de inhibición representó la falta de lisis de rRBCs. El eje Y representa OD405 media y Desviación Estándar (SD, por sus siglas en inglés).

25 La Figura 5A muestra la proteína hfB3 (200 ng), purificada de un proceso de cromatografía de tres pasos, sometida a SDS-PAGE y análisis de tinción con plata. La Figura 5B muestra la inhibición de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humana por la proteína hfB3 purificada. Eje X de izquierda a derecha: suero humano agotado de proteína del factor B complementado con 0  $\mu$ g de proteína del factor B humana, de tipo salvaje, purificada (hfB wt) (control, sin lisis de rRBCs); suero humano agotado de proteína del factor B complementado en cada reacción con una mezcla de 0,5  $\mu$ g de proteína del factor B humana, de tipo salvaje, purificada y 1,0, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1 o 0,05  $\mu$ g de hfB3, como se indica. 100% de inhibición representa la falta de lisis de rRBCs. El eje Y representa OD405 media y SD.

30 La Figura 6 muestra la actividad biológica de dos poblaciones de proteína hfB3. Se muestran los resultados para la proteína hfB3 purificada con la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés) del Pico I y el Pico II para la inhibición de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humana. Eje X de izquierda a derecha: suero humano agotado de proteína del factor B complementado con 0  $\mu$ g de proteína del factor B humana, purificada (control, sin lisis de rRBCs); suero humano agotado de proteína del factor B complementado en cada reacción con una mezcla de 0,5  $\mu$ g de proteína del factor B humana, de tipo salvaje, purificada y varias cantidades de proteína hfB3 que variaban de 1,0 a 0,05  $\mu$ g. 100% de inhibición representa la falta de lisis de rRBCs. El eje Y representa OD405 media y SD.

35 La Figura 7A y 7B muestran la cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC, por sus siglas en inglés) de sobrenadantes de cultivo de células sin procesar que contienen ya sea la proteína hfB3 o la proteína hfB3-292S después de la incubación de cultivo de tejido durante 72 horas ( $2 \times 10^6$  células/ml). A) Sobrenadantes de células que producen hfB3 (.....), células que producen la proteína hfB3-292S (\_\_\_\_\_) y células 293 naturales (\_ \_ \_ \_ \_) se aplicaron a un sistema de HPLC Agilent HP1100<sup>MR</sup> utilizando una columna C4 de tamaño reducido de poro Jupiter<sup>MR</sup>

(Phenomenex) y se eluyeron con un gradiente de agua/acetonitrilo (25 - 70% de acetonitrilo) durante 50 minutos que contenía 0,1% de TFA. La elución se supervisó a 215 nm con un detector de PDA. La posición de la proteína de choque térmico 70 (HSP70), presente en las tres muestras, también se muestra. B) La región agrandada del cromatograma mostrado en la Figura 7A se enfoca en la región (25 - 29 minutos) que contenía los Picos I y II de la proteína hfb3 y el pico que contenía la proteína hfb3-292S.

La Figura 8 muestra el análisis de la expresión de la proteína hfb3-Fc al someter 2 µl del sobrenadante de cultivo de células que contenía la proteína hfb3-Fc a una SDS-PAGE no reductora y al análisis de inmunotransferencia Western. (Véase el Ejemplo 12) Dos bandas de la proteína hfb3-Fc se detectaron con marcadores de peso molecular en kDa indicados a la izquierda.

La Figura 9 muestra la tinción con H&E representativa de secciones de parafina de las articulaciones de las patas frontales derechas de ratones de un estudio que sometía a prueba la hfb3-292S en un modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA, por sus siglas en inglés) para artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 16. El Grupo 1 es el grupo de control del vehículo que no recibió cóctel de anticuerpos de colágeno. El Grupo 2 es el grupo no tratado que recibió el cóctel de anticuerpos de colágeno. El Grupo 3 es el grupo tratado que recibió el cóctel de anticuerpos de colágeno y se trató con hfb3-292S.

La Figura 10 muestra mediciones de hinchamiento de articulaciones de un estudio que sometía a prueba la hfb3-292S en un modelo de ratón de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para artritis reumatoide como se describe en el Ejemplo 16. Los grupos son los mismos que aquellos mostrados en la Figura 8, como se describe en el párrafo. La hfb3-292S causó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,0003$ ) en el hinchamiento de articulaciones en comparación con el grupo no tratado (Grupo 2).

La Figura 11 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de un medio de cultivo de células transfectadas con una construcción de expresión de hfb3-292SN480. Este análisis de inmunotransferencia Western se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para hfb3-292S. El carril izquierdo contiene hfb3-292S y el carril derecho es un medio de cultivo de células transfectadas con una construcción de expresión de hfb3-292SN480. El análisis detectó una banda de aproximadamente 55 kDa del medio de cultivo de células de la línea de células de hfb3-292SN480 (carril derecho).

La Figura 12 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de un medio de cultivo de células transfectadas con una construcción de expresión de hfb3-292S/Fc-mono descrita en el Ejemplo 19, posteriormente. Una banda de aproximadamente 115 kDa se detectó mediante un anticuerpo anti-factor B humano de cabra purificado a partir de esta SDS-PAGE no reductora.

La Figura 13 muestra que el sobrenadante de cultivo de células que expresaban la hfb3-292SN480 inhibió la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humana de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 14 muestra que el sobrenadante de cultivo de células que expresaban la hfb3-292S/Fc-mono inhibió la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humana de una manera dependiente de la dosis.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - secuencia de aminoácidos de un factor B del complemento humano de tipo salvaje,

SEQ ID NO: 2 - secuencia de aminoácidos de un análogo de proteína del factor B del complemento humano, hfb3-292S, el cual comprende las siguientes mutaciones: K258A, R259A, K260A, D279G, N285D y C292S.

SEQ ID NO: 3 - secuencia de aminoácidos de un análogo del factor B del complemento humano, hfb3-292S-740N, que comprende las siguientes mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 1: K258A, R259A, K260A, D279G, N285D, D740N y C292S.

SEQ ID NO: 4 - secuencia de aminoácidos de un análogo del factor B del complemento humano, hfb3, el cual comprende las siguientes mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 1: K258A, R259A, K260A, D279G y N285D.

SEQ ID NO: 5 - secuencia de nucleótidos de una construcción de expresión de hfb3, la creación de la cual se describe en el Ejemplo 1.

SEQ ID NO: 6-7 - cebadores para la mutagénesis dirigida a un sitio.

SEQ ID NO: 8 - secuencia de nucleótidos de una construcción de expresión de hfb3-292S, la creación de la cual se describe en el Ejemplo 2.

SEQ ID NO: 9-14 - secuencias parciales de aminoácidos de las proteínas del factor B del complemento de un humano, un ratón, una rata, un cerdo, un mono y una oveja, respectivamente.

SEQ ID NO: 15-16 - cebadores para la mutagénesis dirigida a un sitio.

SEQ ID NO: 17 - secuencia de aminoácidos de un análogo de proteína del factor B del complemento humano, hfb4.

SEQ ID NO: 18 - secuencia de nucleótidos de una construcción de expresión de hfb3-Fc, la creación de la cual se

describe en el Ejemplo 12.

SEQ ID NO: 19-20 - cebadores para la mutagénesis dirigida a un sitio.

SEQ ID NO: 21 - secuencia de aminoácidos de un análogo de proteína del factor B del complemento humano, hfB3-Fc.

5 SEQ ID NO: 22 - secuencia de aminoácidos de un análogo de proteína del factor B del complemento humano, hfB3-292S-Fc.

SEQ ID NO: 23 - secuencia de aminoácidos de un análogo de proteína del factor B del complemento humano, hfB3-292S-740N-Fc.

SEQ ID NO: 24 - secuencia de nucleótidos de una construcción de expresión para expresar la hfB3-292SN480.

SEQ ID NO: 25 - secuencia de nucleótidos de construcción de expresión de genes para hfB3-292S/Fc-mono.

10 SEQ ID NO: 26 - secuencia de aminoácidos de hfB3-292S/Fc-mono.

SEQ ID NO: 27 - secuencia de aminoácidos de un dominio Fc.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo de células, virología y similares las cuales se encuentran dentro de la habilidad de una persona experta en el campo. Esas técnicas se dan a conocer completamente en este documento y/o en la bibliografía actual, por ejemplo, Sambrook, Fritsch and Maniatis eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Celis J. E. "Cell Biology, A Laboratory Handbook" Academic Press, Inc. (1994) y Bahnsen *et al.*, J. of Virol. Methods, 54:131-143 (1995).

25 Se contempla que cualquier procedimiento, preparación o composición descritos en este documento se puede implementar con respecto a cualquier otro procedimiento, preparación o composición descrito en este documento. El uso de la palabra "un" o "una" cuando se utiliza en conjunto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "por lo menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término/frase "y/o" cuando se utiliza en una lista significa que uno o más de los artículos listados se pueden utilizar, por ejemplo, no está limitado a uno o todos los elementos.

30 Durante la producción y purificación del análogo de proteína del factor B del complemento designado hfB3 (SEQ ID NO: 4), se detectaron dos poblaciones del análogo de proteína del factor B del complemento. Una población tuvo la actividad deseada para el análogo de proteína del factor B del complemento (Pico I), mientras que la otra población tuvo sustancialmente menos de la actividad deseada (Pico II), por ejemplo, véase las Figuras 6 y 7A. Los resultados de la caracterización de las dos poblaciones sugirieron que las dos poblaciones difirieron en sus patrones de enlaces de disulfuro. Cuando la cisteína libre (posición 292 de la SEQ ID NO: 4) se mutó a una serina, el Pico II fue indetectable. La

35 Figura 6 muestra que la fracción del Pico II exhibe alguna capacidad para inhibir la actividad del complemento/hemolítica, pero con mucho menos capacidad por µg de proteína en comparación con la fracción del Pico I. También es posible que la actividad inhibitoria del complemento/hemolítica observada con el Pico II sea principalmente o solo un resultado de que el Pico II contiene algo de hfB3 con una cisteína libre en la posición 292, posiblemente como resultado de que el Pico I y el Pico II no se resuelven completamente entre sí.

40 La cisteína que corresponde a la posición 292 de la SEQ ID NO: 1 está sumamente conservada entre las proteínas del factor B del complemento de diferentes especies de mamíferos (por ejemplo, véase la Tabla 1). Las secuencias sumamente conservadas son importantes habitualmente para la función de una proteína. "La teoría neutra de la evolución molecular establece que las mutaciones en aminoácidos ocurren de una manera estocásticamente constante siempre y cuando las mutaciones no tengan efecto sobre la función del producto génico [Kimura M: The theory of

45 molecular evolution. Sci Am 1979, 241(5):98-100, 102, 108 passim]. Por otra parte, los aminoácidos que son importantes para la función y estructura de la proteína no pueden mutar sin un efecto perjudicial sobre la actividad de la proteína. Por lo tanto, estos aminoácidos cambiarán muy lentamente en una familia de proteínas determinada durante la evolución". (Liu *et al.* BMC Bioinformatics, 2006, 07:37).

50 **Tabla 1. Cisteína Conservada en la Proteína del Factor B del Complemento**

55 HUMANA*	IGASNFTGAKKCLVNLIKVASV	(SEQ ID NO: 9)
RATÓN	IGSSNFTGAKRCLTNLIKVASV	(SEQ ID NO: 10)
RATA	IGASNFTGAKRCLANLIKVASV	(SEQ ID NO: 11)
CERDO	IGARNFTGAKNCLKDFIEKVASV	(SEQ ID NO: 12)
MONO	IGAGNFTGAKKCLVNLIKVASV	(SEQ ID NO: 13)
60 OVEJA	VGAHNFTGAKNCLRDFIEKVASV	(SEQ ID NO: 14)



\*C corresponde a la posición 292 para un factor B humano (SEQ ID NO: 1)

5 La mutación de la cisteína en el aminoácido 292 del análogo de proteína del factor B del complemento a una serina, por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (hfB3-292), redujo en gran medida, si es que no eliminó, la cantidad de la población del Pico II (sustancialmente menos activa) y el análogo de proteína del factor B del complemento hfB3-292S retuvo su actividad, en este caso la capacidad para inhibir o reducir la actividad del complemento. (Por ejemplo, véase el Ejemplo 10, posteriormente).

10 Sin desear estar limitado a teoría alguna, la población menos activa (fracción del Pico II) de la proteína hfB3 pudo ser el resultado del doblamiento erróneo de la proteína hfB3. Es posible que la generación de la mayoría de la población del Pico II fue debido a la combinación de la cisteína libre y las mutaciones introducidas a la proteína hfB3 debido a que cuando las células se diseñaron para expresar una proteína del factor B del complemento humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) de una manera similar a aquella utilizada para la proteína hfB3, solo se detectó una población de la proteína del factor B humano de tipo salvaje (los datos no se muestran).

15 Esta mutación de una cisteína libre permite un rendimiento más alto del análogo del factor B del complemento activo puesto que la mayor parte, si no es que la totalidad, del análogo de proteína del factor B del complemento producido es una forma activa. Adicionalmente, la mutación de una cisteína libre da por resultado una proteína más estable puesto que todas las cisteínas no mutadas, restantes son parte de un enlace de disulfuro y no existe una cisteína libre dejada que pueda participar en reacciones posiblemente indeseables y perjudiciales. Adicionalmente, la mutación de la cisteína libre parece tener inesperadamente una agregación reducida o eliminada del análogo de proteína del factor B del complemento, por ejemplo, véase el Ejemplo 6 y la Figura 3.

25 Los análogos de proteína del factor B del complemento descritos en la Publicación del PCT No. WO08/106644 o la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665 (las cuales se incorporan ambas a manera de referencia en su totalidad) pueden tener su cisteína libre mutada y pueden retener aún su función deseada, mientras que se benefician de las ventajas mencionadas anteriormente de la mutación. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquiera de los análogos de proteína del factor B del complemento que se describen en la Publicación del PCT No. WO08/106644 o la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665 con una mutación de una cisteína libre.

35 El término "cisteína libre" se refiere a una cisteína que es parte de una proteína o un péptido, en donde la cisteína libre no forma un enlace de disulfuro con otra cisteína en la misma proteína o péptido. En algunos casos una "cisteína libre" de un análogo de proteína no forma un enlace de disulfuro con otra cisteína (en la misma proteína o péptido), cuando el análogo de proteína tiene una actividad deseada, pero puede formar un enlace de disulfuro con otra cisteína (en la misma proteína o péptido) de una forma menos activa o inactiva del análogo de proteína.

40 El término "mediado por el complemento" se refiere a un proceso o una enfermedad que involucra el complemento. Habitualmente, una enfermedad o afección "mediada por el complemento" es una en donde la actividad del complemento es una de las causas fundamentales de la enfermedad o afección y en donde la inhibición o el bloqueo de la actividad del complemento disminuye el grado de la enfermedad o afección. Los ejemplos de numerosas enfermedades o afecciones mediadas por el complemento se describen en este documento.

45 El término "de tipo salvaje" (o tipo salvaje), el cual se utiliza de manera intercambiable con "nativo", se refiere a una proteína de origen natural codificada por el genoma de un mamífero, un ácido nucleico de origen natural y así por el estilo. En algunos casos, puede haber realmente más de una proteína que corresponde a la versión de tipo salvaje, por ejemplo, debido a diferencias alélicas; diferentes isoformas; y/o una variación genética entre diferentes individuos de una especie.

50 El término "análogo" se refiere a un derivado estructural de una proteína (proteína precursora). Un análogo no retiene necesariamente todas las propiedades de la proteína precursora y en algunos casos tiene por lo menos una propiedad alterada en comparación con la proteína precursora, nativa, correspondiente. En algunas realizaciones, una proteína precursora es una proteína nativa (de origen natural). Un análogo o una proteína variante se produce al reemplazar, sustituir, suprimir y/o agregar aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos nativa, correspondiente de la proteína. Las sustituciones o inserciones implican habitualmente aminoácidos de origen natural, pero también pueden incluir aminoácidos sintéticos o no convencionales. En algunas realizaciones, un análogo o variante se produce al mutar una proteína, por ejemplo, mutar un ácido nucleico que la codifica. Un análogo retendrá habitualmente por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, por lo menos 99,5% de la secuencia de aminoácidos de la proteína precursora, nativa, correspondiente (por ejemplo, tendrá ese porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos con respecto a la proteína precursora de origen natural determinado sobre la longitud de la proteína

precursora completa o, en ciertas realizaciones, sobre un dominio específico o una porción de la proteína precursora). Los análogos también incluyen fragmentos de análogos de longitud completa que comprenden una porción de la secuencia de aminoácidos y ya sea retienen una o más actividades biológicas de la proteína precursora o de un análogo de longitud completa o inhiben una o más de esas actividades biológicas.

5 El término “corresponde” o “que corresponde” cuando se refiere a un aminoácido en una proteína particular se refiere al aminoácido particular en esa proteína particular y también a un aminoácido en una proteína relacionada o similar y puede proporcionar una función similar a la proteína. Por ejemplo, se puede encontrar que un aminoácido en un factor B del complemento de humano corresponde con un aminoácido en un factor B del complemento de murino o en una variante alélica de humano del factor B, determinado usualmente al alinear las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, una persona experta en el campo puede alinear dos o más secuencias relacionadas, tal como las SEQ ID NOs:9-14, para determinar aminoácidos correspondientes, por ejemplo, utilizando un programa BLAST (por ejemplo, véase la Tabla 1, anteriormente). También, los aminoácidos correspondientes se pueden determinar, por ejemplo, al alinear configuraciones (por ejemplo, una configuración de escisión de proteasa) dentro de proteínas relacionadas o no relacionadas. Este alineamiento también se puede utilizar para deducir secuencias consensuales de una proteína objetivo o dominios de la misma.

20 Como se utiliza en este documento, el término “gen” se refiere habitualmente a una región de codificación para una proteína. Sin embargo, en algunos contextos en este documento será claro que el término “gen” también se refiere a elementos (por ejemplo, elementos reguladores) vinculados operativamente a una región de codificación tal como promotores, potenciadores, sitios de empalme (aceptadores y/o donadores), señales de poliadenilación, intrones, regiones no traducidas 5', regiones no traducidas 3', etcétera.

25 El término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un gobierno estatal o está listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para el uso en humanos.

30 Un “beneficio terapéutico” no es necesariamente una cura para una enfermedad o afección particular (inclusive cualquier enfermedad o afección descrita en este documento), sino que preferiblemente, comprende un resultado el cual incluye más habitualmente el alivio de la enfermedad o afección, la eliminación de la enfermedad o afección, la reducción de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección, la prevención o alivio de una enfermedad secundaria o la afección que resulta de la aparición de una enfermedad o afección primaria, la disminución de la probabilidad de desarrollar una afección o enfermedad, la disminución de la gravedad de una enfermedad o afección, el cambio del carácter de una enfermedad o afección, el acortamiento del curso de una enfermedad o afección, la disminución de la velocidad o prevención del progreso o empeoramiento de una enfermedad o afección y/o la prevención de la enfermedad o afección.

#### Análogos del factor B del complemento

40 La presente invención incluye análogos de proteína del factor B del complemento y polipéptidos que comprenden análogos del factor del complemento y sus usos. Algunas realizaciones de la invención incluyen un análogo de proteína del factor B del complemento en donde una cisteína libre ha sido mutada. En algunas realizaciones, esta mutación de una cisteína libre puede comprender una supresión de la cisteína libre o la sustitución de la cisteína libre por otro(s) aminoácido(s). Una cisteína libre puede ser sustituida por esencialmente cualquier aminoácido, que aún permita que el análogo de proteína del factor B del complemento retenga por lo menos alguna(s) de la(s) característica(s) deseada(s), tal como la capacidad para regular por decremento, disminuir o eliminar la actividad del complemento. Una sustitución puede ser por uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, una cisteína libre se sustituye por una serina. En algunas realizaciones, una cisteína libre se sustituye por uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de alanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina. En algunas realizaciones, una cisteína libre corresponde al aminoácido 292 de la SEQ ID NO: 1.

55 En algunas realizaciones, la invención proporciona análogos de proteína del factor B del complemento que no comprenden una cisteína libre. La invención también proporciona procedimientos para hacer o producir un análogo de proteína del factor B del complemento que comprenden la mutación de una cisteína libre.

La mutación de una cisteína libre se puede combinar con otras mutaciones de una proteína del factor B del complemento, por ejemplo, otras mutaciones como se describen en este documento.

60 La invención también proporciona análogos de proteína del factor B del complemento en donde la cisteína que corresponde al aminoácido 292 de la SEQ ID NO: 1 es mutada. Esta mutación puede ser una supresión, inserción o sustitución, tal como una sustitución de serina u otras mutaciones como se describe en este documento.

Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia diferente a la secuencia de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras) se pueden hacer en la secuencia de origen natural. Generalmente, una sustitución de aminoácidos conservadora no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que ocurre en la secuencia precursora o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia precursora). Los ejemplos de estructuras de polipéptidos secundarias y terciarias reconocidas en el campo se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991). Las sustituciones conservadoras incluyen, pero no están limitadas a, aquellas de las siguientes agrupaciones: Residuos ácidos Asp (D) y Glu (E); Residuos Básicos Lys (K), Arg (R) y His (H); Residuos Sin Carga Hidrófilos Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q); Residuos Sin Carga Alifáticos Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I); Residuos Sin Carga No Polares Cys (C), Met (M) y Pro (P); Residuos Aromáticos Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W); Residuos que contienen un grupo alcohol S y T; Residuos alifáticos I, L, V y M; Residuos asociados con cicloalqueno F, H, W e Y; Residuos hidrófobos A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y; Residuos con carga negativa D y E; Residuos polares C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T; Residuos con carga positiva H, K y R; Residuos pequeños A, C, D, G, N, P, S, T y V; Residuos muy pequeños A, G y S; Residuos implicados en la formación de vueltas A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T; y Residuos flexibles Q, T, K, S, G, P, D, E y R.

En algunas realizaciones, se utiliza una sustitución no conservadora.

En algunas realizaciones, las mutaciones incluyen, pero no están limitadas a, sustituciones de uno o más aminoácidos, supresiones de uno o más aminoácidos o inserciones de uno o más aminoácidos. Las mutaciones incluyen, pero no están limitadas a, aquellas las cuales: (1) reducen la susceptibilidad del análogo del factor B del complemento a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad del análogo del factor B del complemento a la oxidación, (3) alteran la afinidad de enlace del análogo del factor B del complemento para formar complejos de proteínas, (4) alteran (por ejemplo, incrementan o disminuyen) las afinidades de enlace del análogo del factor B del complemento, (5) reducen la inmunogenicidad del análogo del factor B del complemento; (6) incrementan la estabilidad (por ejemplo, termoestabilidad) del análogo del factor B del complemento; (7) reducen la agregación del análogo de proteína del factor B del complemento; o cualquier combinación de 1-7.

En algunas realizaciones, el análogo del factor B del complemento humano de la invención compite por el enlace del factor B del complemento nativo. Por ejemplo, el factor B del complemento nativo puede enlazarse con el factor C3b del complemento para formar el C3bB, por ejemplo, véase la Figura 1B. El factor B que es parte del complejo de C3bB puede enlazarse al factor D. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento de la invención puede competir por el enlace de un factor B nativo para (i) enlazarse a C3b, (ii) enlazarse al factor D o (iii) ambos.

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención es un análogo de la SEQ ID NO: 4 que tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces de disulfuro y un aminoácido de cisteína libre que ha sido sustituido por otro aminoácido, más de un aminoácido o ha sido suprimido sin sustitución.

El análogo de proteína del factor B del complemento de la invención ha incrementado la afinidad de enlace de C3b en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente y el análogo de proteína del factor B del complemento comprende (i) actividad de proteasa disminuida en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente; (ii) capacidad disminuida para ser escindida por la proteína del factor D en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente; o (iii) actividad de proteasa disminuida en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente y capacidad disminuida para ser escindida por una proteína del factor D en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente.

En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende una mutación en el dominio de enlace de C3b y el análogo de proteína del factor B del complemento exhibe afinidad de enlace incrementada hacia C3b en comparación con la afinidad de enlace de una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente hacia C3b. En algunas realizaciones, una mutación en el dominio de enlace de C3b comprende (i) una sustitución o supresión de un ácido aspártico que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1, una sustitución o supresión de una asparagina que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1 o ambos; o (ii) una inserción de por lo menos un aminoácido después del ácido aspártico o la asparagina. En algunas realizaciones, este ácido aspártico, asparagina o ambos son sustituidos por uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, un ácido aspártico que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina, alanina o asparagina. En algunas realizaciones, una asparagina que

corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina, alanina o ácido aspártico. En algunas realizaciones, un ácido aspártico que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye por glicina y una asparagina que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye por ácido aspártico.

- 5 En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento es un análogo de proteína del factor B del complemento humano, basado en una proteína del factor del complemento humana.

La presente invención incluye análogos de proteína del factor B del complemento, por ejemplo, que se pueden suministrar como proteínas y/o por vía de la transferencia de genes para atenuar la vía alternativa de activación del complemento. Estos análogos pueden superar obstáculos que impiden el desarrollo de algunos inhibidores del complemento que incluyen, por ejemplo: 1) evitar la supresión inmune sistémica a largo plazo; 2) lograr la eficacia en vista de los niveles de otra manera prohibitivamente altos de factores del complemento en la sangre; 3) lograr niveles suficientes y distribución del análogo de proteína del factor B del complemento terapéutico en proximidad de la retina y membrana de Bruch's para la eficacia; 4) lograr una actividad del análogo de proteína del factor B del complemento terapéutico dentro de las drusas; 5) lograr una duración suficiente del suministro terapéutico para tratar una enfermedad crónica; 6) lograr la eficacia sin interferir perjudicialmente con las actividades clásicas de la vía del complemento en la parte posterior del ojo; y/o 7) evitar o disminuir una reacción inmune (por ejemplo, una reacción inmune local) hacia el producto terapéutico.

20 La atenuación del bucle de retroalimentación positivo en la vía alternativa es un medio para regular por decremento la vía alternativa completa. Un medio adecuado para atenuar el bucle de retroalimentación de la vía alternativa es interferir con la función o los niveles de proteínas del factor B (fB) del complemento. Algunas realizaciones de la invención utilizan un análogo del factor B del complemento para atenuar la actividad del complemento.

25 Un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención puede comprender por lo menos una mutación que corresponde a una mutación de la SEQ ID NO: 1 seleccionada del grupo que consiste de K258A, R259A, K260A, D279G, N285D y D740N. En algunas realizaciones, comprende mutaciones que corresponden a K258A, R259A, K260A, D279G y N285D de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una mutación que corresponde a D740N de la SEQ ID NO: 1.

30 Con fines de ejemplificación, los análogos específicos de la proteína del factor B del complemento se describen en este documento. La proteína del factor B se puede manipular en una variedad de maneras, por ejemplo, para inhibir o reducir la activación de la vía alternativa. En algunas realizaciones, los sitios particulares en el factor B se pueden alterar, por ejemplo, mediante la mutagénesis dirigida a un sitio, de modo que la molécula ya no funciona apropiadamente por completo. En algunas realizaciones, la porción o dominio de enzima (por ejemplo, el dominio de proteasa, el cual es una serina proteasa) de la molécula se puede alterar de modo que la molécula ya no tiene actividad enzimática o tiene actividad enzimática reducida (por ejemplo, reducida por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces). En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una mutación en el sitio activo del dominio de serina proteasa, en donde la mutación disminuye o elimina la capacidad del análogo de proteína del factor B del complemento para escindir el factor del complemento C3 en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa, correspondiente.

45 En algunas realizaciones, esto se puede lograr al alterar el residuo que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, esta mutación comprende una supresión o una sustitución de un ácido aspártico que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un ácido aspártico (D), que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1, se sustituye por otro aminoácido tal como asparagina (N), alanina (A), ácido glutámico (E), serina (S), tirosina (Y) o glicina (G). La numeración de los aminoácidos particulares del factor B se refiere en este documento al polipéptido completo que incluye el péptido de señal y se refleja en la SEQ ID NO: 1. Hourcade *et al.* (JBC (1998) 273(40):25996-6000) observan que los aminoácidos 739-746 de la SEQ ID NO: 1 (referida en Hourcade *et al.*, como los aminoácidos 714-721 debido a que la numeración de Hourcade *et al.* no incluye la secuencia/péptido de señal de 25 aminoácidos) desempeñan un papel en la función de serina proteasa de la proteína del factor B. Adicionalmente, N693, T694 y D740 pueden constituir o pueden ser parte del sitio de unión al sustrato y H526, D576 y S699 pueden constituir o pueden ser parte del centro catalítico, por ejemplo, véase Xu *et al.*, J. Biol. Chem. 2000 275(1):378-85. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B comprende una mutación de por lo menos uno de los aminoácidos seleccionados de los aminoácidos 739-746 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 739 de la SEQ ID NO: 1 por una alanina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de asparagina, ácido glutámico, alanina, serina y tirosina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 741 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de triptófano

y alanina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 742 de la SEQ ID NO: 1 por glutamina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 743 de la SEQ ID NO: 1 por fenilalanina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 745 de la SEQ ID NO: 1 por fenilalanina. En algunas realizaciones, el análogo de proteína del factor B del complemento comprende una sustitución del aminoácido que corresponde al aminoácido 746 de la SEQ ID NO: 1 por triptófano o alanina. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B comprende una mutación de uno o dos de los aminoácidos 693 y 694 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, una sustitución o supresión. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B comprende una mutación de uno o dos de los aminoácidos 526, 576 y 699 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, una sustitución o supresión.

Otros sitios en el factor B que se pueden alterar incluyen: 1) el sitio de enlace para properdina (el dominio de enlace de properdina) de tal manera que el enlace ocurre con afinidad más baja (por ejemplo, tal como una afinidad reducida 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con la proteína del factor B de tipo salvaje) o con mayor afinidad (tal como una afinidad incrementada por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con el factor B de tipo salvaje); 2) el sitio de enlace para la proteína C3b (el dominio de enlace de C3b) de tal manera que el enlace ocurre con afinidad más baja (tal como una afinidad reducida por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con la proteína del factor B de tipo salvaje) o con mayor afinidad (tal como una afinidad incrementada por lo menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces en comparación con la proteína del factor B de tipo salvaje, por ejemplo, esto se puede lograr al sustituir el aminoácido que corresponde a la posición 279 y/o la posición 285 de la SEQ ID NO: 1 por otros aminoácidos, por ejemplo, en donde el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 279 se sustituye por asparagina (N), alanina (A) o glicina (G) y/o el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 285 se sustituye por ácido aspártico (D) o alanina (A)); 3) el sitio influido por el factor D de tal manera que el factor D tenga capacidad reducida para escindir o ya no escinda el factor B para formar Bb (por ejemplo, en el sitio de escisión del factor D, por lo menos uno de los aminoácidos en las posiciones que corresponden a la posición 258, 259 o 260 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, puede alterar a la alanina (A) o; una combinación de cualquiera de los puntos 1, 2 y/o 3 anteriores).

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento comprende una alteración en el sitio de escisión del factor D del complemento en donde la alteración disminuye o elimina la escisión del análogo de proteína del factor B del complemento por parte de la proteína del factor D. En algunas realizaciones, una alteración en el sitio de escisión del factor D comprende (i) una sustitución o supresión de una arginina que corresponde al aminoácido 259 de la SEQ ID NO: 1, una sustitución o supresión de una o ambas lisinas que corresponden a los aminoácidos 258 o 260 de la SEQ ID NO: 1 o una sustitución o supresión de la arginina y ambas lisinas; o (ii) una inserción después de la arginina, después de una o ambas lisinas o después de la arginina y una o ambas lisinas. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento tiene aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 258-260 de la SEQ ID NO: 1 cada uno reemplazado por alanina.

La invención incluye (i) análogos de proteína del factor B del complemento que se enlazan a ambos factores C3b y D; (ii) análogos de proteína del factor B del complemento con enlace incrementado (en comparación con su forma nativa) a ambos factores C3b y D; (iii) análogos de proteína del factor B del complemento con enlace incrementado (en comparación con su forma nativa) a la proteína del factor D; y (iv) análogos de proteína del factor B del complemento con enlace incrementado (en comparación con su forma nativa) al complejo de C3bB. La invención también incluye procedimientos para inhibir una vía del complemento utilizando los análogos de proteína del factor B del complemento de la invención, tal como los puntos i-iv, anteriores.

En algunas realizaciones, el enlace incrementado se incrementa por de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10,000, de aproximadamente 10 a aproximadamente 10,000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 10,000, de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 10,000, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 1,000, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 100, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1,000, de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 5,000 o de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 10,000 veces. En algunas realizaciones, el enlace incrementado se incrementa por más de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 o 10,000 veces. En algunas realizaciones, el enlace incrementado se puede medir mediante la inmunoprecipitación o utilizando un dispositivo Biacore (GE Healthcare, Piscataway, NJ), por ejemplo, en comparación con la proteína de tipo salvaje. Como un ejemplo para el punto (i) anterior, el enlace se podría medir mediante la inmunoprecipitación de la proteína con una molécula de enlace para la proteína C3b y a continuación detectar la proteína del factor D en el producto inmunoprecipitado, por ejemplo, utilizando un

inmunoensayo tal como ELISA o Western, por ejemplo, con el enlace incrementado que es demostrado como una banda de intensidad incrementada en un inmunoensayo Western.

5 Los análogos de proteína del factor B de la invención pueden tener un enlace incrementado hacia la proteína C3b y/o la proteína del factor D por un factor de 2 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces en comparación con el enlace del factor B de tipo salvaje al C3b y/o factor D. En algunas realizaciones, el enlace incrementado se puede medir mediante la inmunoprecipitación o utilizando un dispositivo Biacore (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

10 Algunos análogos modificados de proteína del factor B de la invención comprenden una o más de las alteraciones de aminoácidos planteadas en este documento y tienen adicionalmente una o más sustituciones, inserciones o alteraciones de aminoácidos adicionales (por ejemplo, por lo menos o no más de 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20, 50, 100 o 200 alteraciones), análogos los cuales retienen el enlace incrementado hacia el C3b y/o factor D u otra actividad biológica de los análogos de proteína del factor B planteados en este documento, lo cual media la inhibición de la vía del complemento. Estos  
15 análogos pueden tener por lo menos 99,9%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con una proteína del factor B de tipo salvaje, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y pueden retener el enlace incrementado hacia el C3b y/o factor D.

20 En el contexto de la terapia y expresión de genes de los análogos de proteína del factor B del complemento, las alteraciones/mutaciones se reflejarán al nivel de la codificación de ácido nucleico. De esta manera, también se pueden hacer modificaciones al ácido nucleico para incrementar la expresión. Por ejemplo, ciertos codones pueden ser preferidos por una célula hospedante particular. De esta manera, la recodificación se puede realizar donde ciertos codones se prefieren en, por ejemplo, un sistema de expresión o célula de mamífero particular.

25 Algunas realizaciones de la invención se dirigen a polinucleótidos y células hospedantes (u organismos multicelulares hospedantes) que son útiles en la producción de un análogo de proteína del factor B del complemento y se dirigen a los análogos, por ejemplo, hfB3-292S (SEQ ID NO: 2), hfB3-292S-740N (SEQ ID NO: 3), hfB3-292S-Fc (SEQ ID NO: 22), hfB3-292S-740N-Fc (SEQ ID NO: 23) o hfB3-292S/Fc-mono (SEQ ID NO: 26). Los procedimientos para aislar y someter a prueba la actividad mediada por el complemento de esos análogos de proteína del factor B del complemento también  
30 se proporcionan. Algunos aspectos de la invención se dirigen a composiciones/preparaciones farmacéuticas en donde un análogo de proteína del factor B del complemento es un ingrediente activo en un contexto terapéutico y/o profiláctico. Algunas realizaciones de la invención también se dirigen a procedimientos para tratar trastornos mediados por el complemento utilizando una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de proteína del factor B del complemento.

35 En algunas realizaciones de la invención, un análogo del factor B del complemento puede comprender patrones de glicosilación los cuales son distintos de los patrones de glicosilación en un factor B del complemento de origen natural o puede carecer completamente de glicosilación. Los carbohidratos se pueden agregar a y/o se pueden retirar de análogos del factor B que comprenden secuencias de sitios de glicosilación para la glicosilación ligada a N y/u O *in vitro* tal como con un sistema de microsomas pancreáticos de canino (por ejemplo, véase Mueckler y Lodish (1986) Cell 44:629 y  
40 Walter, P. (1983) Meth. Enzymol. 96:84) o similares. Se puede producir un análogo del factor B del complemento de la invención que comprende la adición o supresión/mutación de una secuencia de aminoácidos que corresponde a un sitio de glicosilación, por ejemplo, el cambio del patrón/estado de glicosilación de una proteína puede cambiar las características funcionales de una proteína. Por ejemplo, hfB2, hfB3 (SEQ ID NO: 4), hfB3-292S (SEQ ID NO: 2), hfB3-292S-740N (SEQ ID NO: 3), hfB3-292S-Fc (SEQ ID NO: 22), hfB3-292S-740N-Fc (SEQ ID NO: 23) y hfB3-292S/Fc-mono (SEQ ID NO: 26) comprenden una sustitución N285D, en comparación con un factor B de tipo salvaje (SEQ ID  
45 NO: 1), lo cual da por resultado la eliminación de un sitio de N-glicosilación. (Ambos análogos de proteína del factor B del complemento hfB2 y hfB3 se describen detalladamente en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665). La pérdida del sitio de N-glicosilación altera las características de la proteína. El mismo efecto se puede lograr al producir la proteína en una célula que tiene un patrón de glicosilación alterado o que no glicosila este  
50 N285. Por ejemplo, una proteína o análogo del factor B se puede producir en una célula de E. coli que no glicosila el N285. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento se produce en una célula (por ejemplo, una célula de E. coli) que no glicosila un aminoácido que corresponde a la proteína del factor B de tipo salvaje que es glicosilado habitualmente, por ejemplo, que corresponde al aminoácido N285 de la SEQ ID NO: 1.

55 Como se demuestra en la Publicación del PCT No. WO08/106644 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665, en algunos casos una proteína del factor B nativa de una especie puede tener actividad en una reacción/vía del complemento de otra especie. Por lo tanto, la presente invención también incluye análogos de proteína del factor B del complemento de una especie para inhibir la actividad del complemento en otra especie.

60 En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención es conjugado con PEG, por ejemplo, véase Roberts *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 54(4):459-476 (2002); Veronese, Biomaterials

22(5):405-417 (2001); Fee y Alstine, *Chemical Engineering Science* 61(3):924-939 (2006); Kodera *et al.*, *Progress in Polymer Science* 23(7):1233-1271 (1998); Morar, *Biopharm International* 19(4):34 (2006); y Veronese y Pasut, *Drug Discovery Today* 10(21):1451-1458 (2005). El polietilenglicol (PEG) se puede unir a un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención. En algunas realizaciones, el PEG se une con o sin un conector multifuncional ya sea a través de la conjugación específica de un sitio del PEG (por ejemplo, a la terminación N o la terminación C de un análogo del factor B del complemento) o por vía de grupos amino épsilon que están presentes en los residuos de lisina. En algunas realizaciones, se puede utilizar la derivatización de polímeros lineales o ramificados que da por resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede supervisar estrechamente por medio de SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a un análogo del factor B del complemento. En algunas realizaciones, el PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados de PEG mediante la exclusión de tamaño y/o mediante la cromatografía de intercambio iónico.

En ciertas realizaciones, la terminación carboxi, la terminación amino o ambas de un análogo del factor del complemento, se modifican químicamente. Las modificaciones en la terminación amino tal como la acilación (por ejemplo acetilación) o alquilación (por ejemplo metilación) y las modificaciones en la terminación carboxi tal como la amidación, así como también otras modificaciones terminales, que incluyen la ciclización, se pueden incorporar en varias realizaciones de la invención. Ciertas modificaciones en la terminación amino y/o la terminación carboxi y/o extensiones de péptidos (tal como fusionadas a un polipéptido heterólogo, tal como albúmina, inmunoglobulina o una porción de la misma, tal como un dominio Fc de inmunoglobulina) para la secuencia de núcleo pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tal como: estabilidad incrementada, potencia y/o eficacia incrementadas, resistencia a proteasas del suero, propiedades farmacocinéticas deseables y otras.

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un dominio Fc es C-terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos del análogo del factor B del complemento correspondiente. En algunas realizaciones, un dominio Fc comprende o consiste de los aminoácidos 766-990 de la SEQ ID NO: 21 o los aminoácidos 766-1003 o 786-1003 de la SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, un dominio Fc es los aminoácidos 1-239 o 2-239 de la SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, un dominio Fc es un dominio Fc de humano. En algunas realizaciones, un dominio Fc es de una inmunoglobulina, por ejemplo, una IgG tal como IgG4. En algunas realizaciones, un dominio Fc es capaz de formar un dímero con otro dominio Fc. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento de la invención es capaz de formar dímeros (por ejemplo, dímeros homólogos), tal como, pero no limitado a, a través de interacciones de dominios Fc. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento no forma dímeros o la mayoría de una población/preparación de análogos del factor B del complemento está en la forma de monómeros. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento que comprende un dominio Fc no forma dímeros o la mayoría de esta población/preparación de análogos del factor B del complemento está en la forma de monómeros. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende un dominio Fc que tiene una o más mutaciones de una(s) cisteína(s) en la secuencia del dominio Fc, por ejemplo, una cisteína implicada en la dimerización del dominio Fc. En algunas realizaciones, un dominio Fc comprende una mutación de una o más cisteínas que corresponden a los aminoácidos 17 y/o 20 de la SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende un dominio Fc que tiene una o más mutaciones de una(s) cisteína(s) libre(s) en la secuencia del dominio Fc. En algunas realizaciones, una(s) cisteína(s) es(son) sustituida(s) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina. En algunas realizaciones, una cisteína se suprime. En algunas realizaciones, un conector de secuencias de aminoácidos se utiliza entre secuencias de aminoácidos para un análogo del factor B del complemento y una región Fc. En algunas realizaciones, este conector es un aminoácido, por ejemplo, arginina.

En algunas realizaciones, un polipéptido comprende tanto un análogo del factor B del complemento truncado como una región Fc tal como que comprende aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2 y una región Fc.

La invención proporciona además análogos los cuales son fragmentos de una proteína del factor B del complemento o un análogo que contiene por lo menos una porción de 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 300, 400, 480, 500, 600 o 700 aminoácidos de la proteína o análogo del factor B del complemento y/o comprende 1, 2 o 3 dominios de la proteína y tienen o retienen una o más actividades biológicas de la proteína o análogo del factor B del complemento de tipo salvaje y/o actúa como un inhibidor de un aspecto del sistema del complemento (ya sea la vía clásica, la vía alternativa o ambas). Estos fragmentos se pueden modificar adicionalmente mediante la vinculación o fusión con otra proteína o fragmento tal como un Fc para incrementar la estabilidad y/o vida media del análogo. En algunas realizaciones, un análogo es un fragmento de una proteína o análogo del factor B del complemento y el fragmento tiene por lo menos 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% o 62% de identidad con la secuencia de aminoácidos correspondiente de un factor B del complemento de tipo salvaje.

La invención proporciona proteínas que comprenden un fragmento de una proteína o análogo del factor B del complemento, en donde el fragmento tiene un truncamiento N-terminal y/o C-terminal. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende un truncamiento C-terminal en donde el análogo es truncado en o después (C-terminal a) un aminoácido que corresponde al aminoácido 407, 427, 457, 477, 480, 484, 487, 507 o 527 de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 4. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende un truncamiento C-terminal en donde el análogo es truncado en un aminoácido entre aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 407-487, 470-495 o 477-487 de las SEQ ID NOs:1, 2 o 4. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento de la invención no comprende aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 408-764, 428-764, 458-764, 478-764, 481-764, 485-764, 488-764, 507-764, 527-764 de las SEQ ID NOs:1, 2 o 4. En algunas realizaciones, el truncamiento o fragmentación de una proteína o análogo del factor B puede crear una cisteína libre. Por ejemplo, un truncamiento puede dar por resultado la supresión de una cisteína de un par de cisteínas que forman un enlace de disulfuro en una proteína del factor B del complemento nativa, creando de esta manera un polipéptido que contiene una cisteína, pero no contiene su "asociado" de cisteína nativo. En algunas de esas realizaciones, la cisteína restante del par puede ser mutada, por ejemplo, sustituida por otro aminoácido, tal como una alanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina o la cisteína se puede suprimir, por ejemplo, para eliminar un posible enlace de disulfuro indeseado.

Los análogos de la invención se pueden preparar por medio de varias técnicas, que incluyen pero no están limitadas a, síntesis química o mediante la expresión del análogo recombinante.

Las secuencias de nucleótidos para genes y regiones de codificación que codifican el factor B de humano, así como también las secuencias de aminoácidos son conocidas en el campo. Por ejemplo, un gen que codifica el factor B humano se encuentra en la Base de Datos NCBI No. de Acceso NG\_000013. Una secuencia de codificación para un factor B humano se encuentra en la Base de Datos NCBI No. de Acceso NM\_001710 y una secuencia de aminoácidos para la preproteína del factor B del complemento humano se encuentra en la Base de Datos NCBI No. de Acceso NP\_001701 o P00751. Las secuencias de otras especies de animales también son conocidas en el campo. A modo de comparación, en la secuencia de la proteína del factor B de ratón (por ejemplo, véase la Base de Datos NCBI No. de Acceso P04186), el tercer dominio SCR se localiza en las posiciones 160-217 de esta preproteína de 761 aminoácidos y la proteína del factor B de murino madura abarca las posiciones 23-761. Los primeros 22 aminoácidos de la proteína del factor B de ratón comprenden una secuencia de señal.

Habitualmente, una preproteína del factor B de humano es una proteína de 764 aminoácidos (por ejemplo, véase la SEQ ID NO: 1) en donde un péptido de señal abarca las posiciones de aminoácidos 1-25. La cadena madura del factor B corresponde a las posiciones 26-764 (por ejemplo, véase la SEQ ID NO: 1). Las tres regiones de SCR del factor B de humano son SCR1, también conocida como Sushi 1, que abarca de aproximadamente la posición 35 a aproximadamente la posición 100, SCR2, también conocida como Sushi 2, que abarca de aproximadamente la posición 101 a aproximadamente la posición 160 y SCR3, también conocida como Sushi 3, que abarca de aproximadamente la posición 163 a aproximadamente la posición 220.

La Publicación del PCT No. WO08/106644 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665 describen, *inter alia*, tres análogos de proteína del factor B de humano negativos, dominantes, específicos que se designan como hfB1, hfB2 y hfB3. El primero de estos tres análogos, denominado fB1, contiene un aminoácido mutado en el sitio de proteasa del factor B (fB). Esta porción de fB se enlaza a C3b con afinidad y cinética normales, pero cuando actúa sobre el factor D (fD) y se estabiliza mediante properdina, no funciona como una proteasa y no forma una C3 convertasa. El fB1 contiene una sustitución con N en un aminoácido que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, D740N). El segundo de estos análogos del factor B del complemento, denominado fB2, altera el mismo aminoácido que el fB1, pero además, altera dos aminoácidos adicionales en el dominio de enlace de C3b (sustituciones en aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 279 y 285 de la SEQ ID NO: 1) lo cual incrementa la afinidad de enlace de fB2 hacia C3b, por ejemplo, los cambios D279G, N285D y D740N. La sustitución de N285D retira un sitio de N-glicosilación putativo. El tercero de estos análogos de proteína del factor B del complemento, denominado hfB3, combina las mutaciones que incrementan el enlace a C3b de fB2 con una mutación que desactiva el sitio para la escisión por el factor D, particularmente con sustituciones en aminoácidos que corresponden a los residuos 258, 259 y 260 de la SEQ ID NO: 1, así como también sustituciones en aminoácidos que corresponden a los residuos 279 y 285, por ejemplo, los cambios de K258A, R259A, K260A, D279G y N285D. La escisión del fB de tipo salvaje por parte del factor D activa la fB proteasa. De esta manera, el hfB3, con sus cinco cambios de aminoácidos, se enlaza eficientemente a C3b pero tiene una actividad de proteasa mínima.

El hfB1, el hfB2 y el hfB3 son ejemplos de análogos del factor B de humano los cuales se pueden modificar adicionalmente a análogos del factor B del complemento de la presente invención mediante la mutación de una cisteína libre que corresponde al aminoácido 292 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, mediante la sustitución de la cisteína por una serina, pero la invención no está limitada a esos análogos específicos. Algunas realizaciones de la invención incluyen



5 cualquier análogo del factor B del complemento que module una vía del complemento y no comprenda una cisteína libre. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende, además de una cisteína libre mutada, una o más mutaciones de aminoácidos que corresponden a uno o más de los siguientes aminoácidos en la SEQ ID NO: 1: aminoácido 258, 259, 260, 279, 285, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745 y 746. Estas una o más mutaciones pueden ser una sustitución o supresión del aminoácido o una adición de por lo menos un aminoácido después de o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de los aminoácidos correspondientes. En algunas realizaciones, esta adición altera, cambia, incrementa o inhibe la función del aminoácido listado, por ejemplo, altera su papel (i) en la escisión de otra proteína (por ejemplo, 740), (ii) como un sitio de escisión por otra proteína, (por ejemplo, los aminoácidos que corresponden a los residuos 258, 259 y/o 260 de la SEQ ID NO: 1) o (iii) su papel en el enlace con otra proteína (por ejemplo, aminoácidos que corresponden a los residuos 279 o 285 de la SEQ ID NO: 1).

15 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde a uno o más de los aminoácidos que corresponden a 258, 259 y/o 260 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de alanina, glicina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde a uno, dos o tres de los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 258, 259 y/o 260 de la SEQ ID NO: 1. Algunas realizaciones de la invención comprenden por lo menos una adición de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos inmediatamente después de un aminoácido que corresponde a los aminoácidos 258, 259 y/o 260 de la SEQ ID NO: 1.

20 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 739 de la SEQ ID NO: 1. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 739 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de alanina, glicina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 739 de la SEQ ID NO: 1.

25 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de ácido glutámico, asparagina, alanina, serina, glicina y tirosina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de valina, leucina, isoleucina, treonina, cisteína, metionina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido glutámico, asparagina, alanina, serina, glicina y tirosina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 740 de la SEQ ID NO: 1.

30 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 741 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de triptófano y alanina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 741 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de alanina, glicina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 741 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de triptófano, tirosina y fenilalanina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 741 de la SEQ ID NO: 1.

35 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 742 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por una glutamina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 742 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de glutamina, ácido glutámico, asparagina y ácido aspártico. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 742 de la SEQ ID NO: 1.

40 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 743 y/o 745 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por una fenilalanina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 743 y/o 745 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de fenilalanina, tirosina y triptófano. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de uno o más aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 743, 744 y/o 745 de la SEQ ID NO: 1.

45 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 746 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de triptófano y alanina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 746 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de alanina, glicina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 746 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de triptófano, tirosina y

fenilalanina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 746 de la SEQ ID NO: 1.

5 Algunas realizaciones de la invención comprenden la inserción o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos inmediatamente después de o en lugar de cualquiera de uno o más de los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745 y/o 746 de la SEQ ID NO: 1.

10 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de glicina, alanina y asparagina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de asparagina, ácido glutámico y glutamina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión de un aminoácido que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1. Algunas realizaciones de la invención comprenden la inserción o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos inmediatamente después de o en lugar de un aminoácido que corresponde al aminoácido 279 de la SEQ ID NO: 1.

20 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de alanina y ácido aspártico. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina. Algunas realizaciones de la invención comprenden una supresión del aminoácido que corresponde al aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1. Algunas realizaciones de la invención comprenden la inserción o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos inmediatamente después de o en lugar de un aminoácido que corresponde a un aminoácido 285 de la SEQ ID NO: 1.

30 Algunas realizaciones de la invención comprenden una sustitución de uno o más de los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 279, 282, 283, 284 y 285 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, estos aminoácidos son reemplazados por glicina, isoleucina, prolina, histidina y ácido aspártico, respectivamente.

35 Algunas realizaciones de la invención comprenden mutaciones de los aminoácidos que corresponden a 258, 259, 260, 279 y 285 de la SEQ ID NO: 1 como se describe en este documento.

40 En algunas realizaciones específicas, la invención proporciona un análogo de proteína del factor B, que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2, 3, 21, 22 o 23 (opcionalmente sin ninguna secuencia de señal, por ejemplo, aminoácidos 1-25 contenidos en las mismas). Estos análogos de proteína del factor B se pueden utilizar en los procedimientos de la invención.

45 La invención incluye análogos de proteína del factor B del complemento que comprenden una combinación de las mutaciones (sustituciones, supresiones y adiciones) planteadas en este documento. En algunas realizaciones, estos análogos del factor B del complemento retienen uno o más de los atributos de los análogos de hfb1, hfb2, hfb3, hfb3-292S y hfb3-292S-740N o cualquier otro análogo del factor B del complemento planteado en este documento. La invención proporciona además análogos que son fragmentos (por ejemplo que comprenden uno o más dominios de una proteína del factor B del complemento que tienen una o más de las mutaciones de aminoácidos expuestas en este documento) de esos análogos que tienen uno o más de los atributos de los análogos planteados anteriormente, por ejemplo, hfb3-292SN480. Además, los análogos pueden comprender sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos adicionales (por ejemplo sustituciones conservadoras de aminoácidos, truncamientos de la terminación N o la terminación C, etcétera) del tal manera que el análogo tenga por lo menos 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 75% de identidad con el factor B del complemento de tipo salvaje correspondiente o, en caso de un análogo que comprende un fragmento del factor B del complemento, el análogo tiene por lo menos 99,5%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 70% de identidad entre las partes correspondientes del factor B del complemento análogo y de tipo salvaje.

60 Las proteínas hfb3-292S y hfb3-292SN480 contienen las siguientes características clave de la terminación N a la terminación C: 1) secuencia de señal nativa de proteína del factor B para la secreción eficiente fuera de células de expresión de mamífero tales como las células 293 humanas, células de CHO, células BHK; 2) un sitio de escisión de proteína del factor D dependiente de C3b mutado (cambio de aminoácidos de K258R259K260 a A258A259A260); 3) un sitio de enlace de proteínas de C3b mutado (cambio de aminoácido de D279 a G279 y aminoácidos de N285 a D285)

para hacer posible su enlace estrecho con y captura de la proteína C3b; y 4) una cisteína libre mutada (cambio del aminoácido C292 a S292) para incrementar la cantidad de proteína "activa" o doblada correctamente.

5 En algunas realizaciones de la invención, un análogo de proteína del factor B del complemento humano es por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntico a (i) las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 22 o 23; (ii) aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; (iii) aminoácidos 1-990 o 26-990 de cualquiera de las SEQ ID NOs:22 o 23; aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; y (iv) aminoácidos 1-1003 o 26-1003 de la SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento humano de la invención comprende (i) SEQ ID NOs:2, 3, 22, 23 o 26; (ii) aminoácidos 1-480 de la SEQ ID NO: 2; (iii) aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; (iv) aminoácidos 26-764 de las SEQ ID NOs:2 o 3; (v) aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NOs:22 o 23; o (vi) aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento consiste esencialmente de (i) aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2 o 3; (ii) aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2 o 3; (iii) aminoácidos 26-990 de las SEQ ID NOs:22 o 23; o (iv) aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26.

15 La Figura 1A representa las vías clásica y de lectina del complemento y la Figura 1B la vía alternativa del complemento. Ambas vías utilizan C3b. El complejo C3bBb es una C3 convertasa la cual convierte el C3 a C3b. La disociación espontánea ("descomposición") del C3bBb en minutos conduce a su inactivación, mientras que la properdina estabiliza el complejo C3bBb. El C3b participa en la C3 convertasa para generar el C3b adicional creando de ese modo un bucle de retroalimentación positivo como se muestra por la flecha grande. Varios de los factores que atenúan las vías del complemento, tal como el factor acelerador de descomposición (DAF, por sus siglas en inglés), lo hacen al acelerar la descomposición de la C3 convertasa, C3bBb. Sin desear ser limitado a teoría alguna, algunos de los análogos del factor B del complemento descritos en este documento se enlazan a C3b en lugar de un factor B del complemento nativo, compitiendo de ese modo con el factor B del complemento nativo para la unión a C3b. Algunos análogos del factor B del complemento de la invención se enlazan al C3b para crear un complejo inactivo o un complejo con actividad de C3 convertasa reducida significativamente en comparación con un complejo de C3bBb nativo.

La invención también proporciona análogos del factor B del complemento que comprenden mutaciones de aminoácidos que corresponden a aquellas en el factor B del complemento que interactúan con factores/moléculas que aceleran la descomposición del complejo C3bBb. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende mutaciones de aminoácidos que interactúan con el DAF. Estas mutaciones incluyen, pero no están limitadas a, una o más mutaciones de aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 290, 291, 323, 363, 364 o 407 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, estas mutaciones son una sustitución o supresión de uno o más de los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 290, 291, 323, 363, 364 o 407 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento que comprende una o más de las siguientes mutaciones que corresponden a K323E, K290A, K291A, Y363A, S364A o D407N de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento comprende una de las siguientes combinaciones de mutaciones que corresponden a K290A/K291A, Y363A/S364A o K290A/K291A/Y363A/S364A de la SEQ ID NO: 1. Sin desear ser limitado a teoría alguna, las mutaciones de aminoácidos en un análogo del factor B del complemento que interactúan con factores/moléculas que aceleran la descomposición del complejo C3bBb, pueden inhibir la descomposición de complejos de C3b y un análogo del factor B del complemento de la invención, permitiendo de ese modo que un análogo del factor B del complemento inhiba mejor la actividad del complemento.

Los procedimientos de ejemplo para generar ADNcs (por ejemplo, fB de tipo salvaje humano y tres análogos del factor B del complemento así como también cuatro secuencias de murino análogas) y su incorporación en vectores se detallan en el Ejemplo 8 de la Publicación del PCT No. WO08/106644 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665.

#### Ácidos Nucleicos

50 La invención incluye ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención e incluye vectores que comprenden esos ácidos nucleicos.

Para asegurar la expresión local y a largo plazo de un ácido nucleico de interés, algunas realizaciones de la invención contemplan transducir una célula con un ácido nucleico o vector que codifica un análogo del factor B del complemento de la invención. No se debe interpretar que la presente invención está limitada a algún procedimiento de suministro de ácido nucleico particular y cualquier vehículo de suministro de ácido nucleico disponible con una estrategia de suministro de ácido nucleico ya sea *in vivo* o *in vitro*, o el uso de células manipuladas (tal como la tecnología de Neurotech, Lincoln, RI, por ejemplo, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,231,879; 6,262,034; 6,264,941; 6,303,136; 6,322,804; 6,436,427; 6,878,544), así como también ácidos nucleicos de la invención que codifican un análogo del factor B del complemento per se (por ejemplo, "ADN desnudo"), se puede utilizar en la práctica de la presente invención. Varios vehículos de suministro, tales como vectores, se pueden utilizar con la presente invención. Por ejemplo, vectores virales,

5 lípidos anfitróficos, polímeros catiónicos, tal como polietilenimina (PEI) y polilisina, dendrímeros, tales como moléculas de explosión de peine y moléculas de explosión de estrella, lípidos no iónicos, lípidos aniónicos, vesículas, liposomas y otros medios de ácidos nucleicos sintéticos del suministro de genes (por ejemplo, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,958,325 y 7,098,030; Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en "Liposomes" en "The Therapy of Infectious Disease and Cancer"; y Lopez-Berestein & Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 317-327 y 353-365 (1989); ácidos nucleicos "desnudos" y así por el estilo se pueden utilizar en la práctica de la presente invención.

10 Un vector es un medio mediante el cual un ácido nucleico de interés (por ejemplo, un ácido nucleico terapéutico, por ejemplo, que puede codificar una proteína terapéutica) se introduce en una célula objetivo de interés. Un vector se construye o se obtiene habitualmente a partir de un material de inicio, tal como un ácido nucleico capaz de transportar un gen o transgen extraño el cual es capaz de entrar en y ser expresado en una célula objetivo. Los materiales de inicio adecuados a partir de los cuales se puede obtener un vector incluyen transposones, plásmidos, virus, productos de PCR, ADNcs, ARNms y así por el estilo, como se sabe en el campo. Los procedimientos para obtener o construir un vector de interés incluyen, pero no están limitados a, técnicas de manipulación de genes estándar, reacciones de secuenciación, digestiones de enzimas de restricción, reacciones de polimerasa, PCR, PCR SOEing, ligaduras, reacciones de recombinasa (por ejemplo, tecnología GATEWAY<sup>MR</sup> de Invitrogen) otras enzimas activas en ácidos nucleicos, materiales y procedimientos de propagación de bacterias y virus, productos químicos y reactivos, protocolos de mutagénesis dirigida a un sitio y así por el estilo, como es bien sabido en el campo, véase, por ejemplo, el texto de Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning".

20 Los ácidos nucleicos de la invención comprenderán habitualmente un promotor vinculado operativamente con una secuencia de codificación del análogo de proteína del factor B del complemento. Un promotor puede ser un promotor específico para un tejido, un promotor específico para una célula, un promotor inducible, un promotor reprimible, un promotor constitutivo, un promotor sintético o un promotor híbrido, por ejemplo. Los ejemplos de promotores útiles en las construcciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, un promotor de fagos lambda (PL, por sus siglas en inglés); un promotor temprano de SV40; un promotor de virus de herpes simple (HSV); un promotor de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato de CMV humano; un sistema de promotor sensible a trans-activadores controlados por tetraciclina (tet); un promotor de repeticiones terminales largas (LTR), tal como un MoMLV LTR, BIV LTR o un HIV LTR; un promotor de regiones U3 de virus de sarcoma de murino Moloney; un promotor de Granzima A; una(s) secuencia(s) reguladora(s) del gen de metalotioneína; un promotor de CD34; un promotor de CD8; un promotor de timidina cinasa (TK); un promotor de parvovirus B19; un promotor de PGK; un promotor de glucocorticoides; un promotor de proteína de choque térmico (HSP), tal como promotores de HSP65 y HSP70; un promotor de inmunoglobulina; un promotor de MMTV; un promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV); un promotor de lac; un promotor de CaMV 35S; y un promotor de nopalina sintetasa. En algunas realizaciones, un promotor es un promotor de MND (Robbins *et al.*, 1997, J. Virol. 71:9466-9474) o un promotor de MNC, el cual es un derivado del promotor de MND en el cual los potenciadores de LTR se combinan con un promotor de CMV mínimo (Haberman *et al.*, J. Virol. 74(18):8732-8739, 2000).

40 En algunas realizaciones, un vector de la invención comprende un intrón, por ejemplo, como parte del gen que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento. Los intrones heterólogos son conocidos y los ejemplos no limitantes incluyen un intrón del gen de  $\beta$ -globina humano. Un intrón puede ser de un gen del factor B del complemento o un intrón heterólogo.

45 Las secuencias de señal o secuencias líderes son conocidas y se pueden utilizar en construcciones de expresión de análogos del factor B del complemento. Las secuencias de señal se traducen en un marco como un péptido unido al extremo amino-terminal de un polipéptido preferido, la secuencia de señal secretora causará la secreción del polipéptido al interactuar con la maquinaria de la célula hospedante. Como parte del proceso secretor, esta secuencia de señal secretora será escindida. La secuencia de señal secretora de fosfatasa alcalina placentaria humana es un ejemplo de una secuencia de señal útil. La presente invención no está limitada por secuencias de señal secretoras, específicas y otras secuencias son conocidas para aquellas personas expertas en el campo. El término "secuencia de señal" también se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido secretor. Si se incluye una secuencia señal, puede ser ya sea una secuencia del factor B del complemento de tipo salvaje, una secuencia homóloga o una secuencia heteróloga.

#### 55 Vectores Virales

60 La presente invención incluye vectores virales que codifican un(unos) análogo(s) del factor B del complemento de la invención. Los ejemplos de vectores virales que son útiles en la presente invención se describen en la Publicación del PCT No. WO08/106644 y Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665. La presente invención no está limitada a un vector viral particular. Los vectores virales incluyen, pero no están limitados a, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 7,045,344), vectores AAV (por ejemplo, véase Patente de los Estados Unidos No. 7,105,345), vectores virales de Herpes (por ejemplo, véase

las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,830,727 y 6,040,172), hepatitis (por ejemplo, hepatitis D), vectores virales (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,225,347), vectores de SV40, vectores de EBV (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,521,449) y vectores de virus de la enfermedad de Newcastle (por ejemplo, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,146,642, 7,442,379, 7,332,169 y 6,719,979). En algunas realizaciones, un vector lentiviral es un vector de HIV, EIAV, SIV, FIV o BIV. La invención también proporciona una célula que produce un vector viral de la invención.

Los ejemplos de los sistemas de BIV se describen, por ejemplo, en Matukonis *et al.*, 2002 *Hum. Gene Ther.* 13, 1293-1303; Molina *et al.*, 2002 *Virology*. 304, 10-23; Molina *et al.*, 2004 *Hum. Gene Ther.*, 15, 65-877; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,864,085, 7,125,712, 7,153,512; Publicación del PCT No. WO08/106644 y Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665.

Los viriones de vectores de la invención se pueden administrar *in vivo* o *in vitro* a células (por ejemplo, células de mamífero). Los vectores (virales o no virales) se pueden utilizar para transducir o transformar células que incluyen, pero no están limitadas a, células no diferenciadas, células diferenciadas, células somáticas, células primitivas y/o células madre. En algunas realizaciones, las células madre se proponen para la administración a un humano y no para el implante en una mujer pseudo-embarazada adecuadamente para la diferenciación y el desarrollo en un bebé.

En algunas realizaciones, un vector viral de la invención comprende un factor acelerador de la descomposición (DAF). Por ejemplo, un vector viral envuelto incluye un DAF sobre la membrana viral. En algunas realizaciones, un DAF es un DAF de tipo salvaje. En algunas realizaciones, un DAF es parte de una proteína de fusión con una proteína de envoltura, por ejemplo, véase Guibinga *et al.*, *Mol Ther.* 2005 11(4):645-51. En algunas realizaciones, una célula productora de BIV expresa un DAF.

#### Producción de Análogos del Factor B del Complemento de la Invención

Los análogos de proteína del factor B del complemento de la invención se pueden producir a partir de una célula. En algunas realizaciones, el análogo de proteína del factor B del complemento entonces se purifica de la célula y/o del medio de cultivo de células.

La invención incluye (i) células que comprenden un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un análogo del factor B del complemento de la invención y/o (ii) células que expresan un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención. En algunas realizaciones, se utiliza una célula de mamífero. En algunas realizaciones, se utiliza una célula procarionte.

Las células hospedantes son transfectadas o transducidas habitualmente con un vector de expresión o clonación para la producción de proteínas y se cultivan en medios nutrientes convencionales que se modifican como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas o para procedimientos de purificación y/o concentración corriente abajo.

Las células hospedantes adecuadas para la clonación o expresión de una región de codificación en un vector son células procariontes, de levadura o eucariontes superiores. Los procariontes adecuados para este propósito incluyen, pero no están limitados a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como también Bacilli tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. En algunas realizaciones, un hospedante de clonación de *E. coli* es *E. coli* 294 (por ejemplo, ATCC 31,446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (por ejemplo, ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (por ejemplo, ATCC 27,325) pueden ser adecuadas.

Además de los procariontes, los microbios eucariontes tales como hongos filamentosos o levadura son hospedantes de clonación o expresión adecuados. La *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, se utiliza comúnmente entre los microorganismos hospedantes, eucariontes, inferiores. Sin embargo, una variedad de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en este documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedantes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (por ejemplo, ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (por ejemplo, ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (por ejemplo, ATCC 24,178), *K. waltii* (por ejemplo, ATCC 56,500), *K. drosophilae* (por ejemplo, ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (por ejemplo, EP402,226); *Pichia pastoris* (por ejemplo, EP183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (por ejemplo, EP244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedantes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedantes adecuadas, por ejemplo, para la expresión de proteínas glicosiladas, se pueden derivar de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Numerosas cepas de baculovirus y variantes y células hospedantes de insecto permisivas, correspondientes de hospedantes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* se han identificado y se pueden utilizar para expresar proteínas. Una variedad de cepas virales para la transfección se pueden utilizar para la expresión de proteínas y están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y estos virus se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patata, soya, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como hospedantes.

Algunas realizaciones de la invención utilizan células de vertebrados o mamíferos y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) puede ser un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células hospedantes de mamífero útiles son la línea de células CVI de riñón de mono transformada por SV40 (por ejemplo, COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o 293T que incluyen cualquier línea de células subclonadas para el crecimiento en un cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977) tal como 293 Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA)) o 293FT; células de riñón de hámster bebé (por ejemplo, BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino; células de ovario de hámster chino/DHFR (por ejemplo, CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (por ejemplo, TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (por ejemplo, CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (por ejemplo, HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (por ejemplo, MOCK, ATCC CCL 34); células CF2TH; células de riñón de rata búfalo (por ejemplo, BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (por ejemplo, W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (por ejemplo, Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (por ejemplo, MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1983)); células MRC 5; y células FS4.

En algunos casos, una célula hospedante se puede modificar para disminuir o eliminar la expresión de una proteína endógena. Por ejemplo, si un análogo de proteína del factor B del complemento se debe producir en una célula hospedante particular (por ejemplo, una célula de CHO), entonces la célula hospedante se podría modificar de manera que la expresión de la proteína del factor B nativa de la célula hospedante (por ejemplo, factor B de hámster) se reduzca o se elimine. Esto puede ser ventajoso para la purificación corriente abajo del análogo de proteína del factor B del complemento. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para producir un análogo de proteína del complemento de la invención que comprende reducir o eliminar la expresión de la proteína del complemento nativa, correspondiente en la célula hospedante. Los procedimientos para reducir, eliminar o desactivar la expresión de una proteína de célula hospedante son conocidos en el campo. Por ejemplo, el nivel de expresión de la proteína se puede reducir o eliminar al diseñar la célula hospedante para expresar ARN inhibitorio (por ejemplo, ARNi) específico para el ARN que codifica la proteína. Por ejemplo, Clontech (Mountain View, CA) vende varios vectores y equipos, tales como aquellos referidos como parte de los Sistemas de ARNi KNOCKOUT<sup>MR</sup>, para desactivar la expresión de proteínas en una célula hospedante. Otros procedimientos incluyen la fijación como objetivo de genes mediante la recombinación homóloga lo cual permite la introducción de mutaciones específicas en cualquier gen clonado, por ejemplo, véase Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994-1998, Secciones 9.16 y 9.17. Esto se puede utilizar para desactivar el gen que expresa la proteína de célula hospedante.

Otro procedimiento el cual se puede utilizar para reducir la expresión de una proteína endógena, involucra el uso de un factor de transcripción fijado como objetivo que reprime la expresión de la proteína endógena. Por ejemplo, un dominio represor de un factor de transcripción se puede unir o fusionar a un dominio de enlace de ADN tal como un polipéptido de dedo de zinc. Una persona experta en el campo puede diseñar polipéptidos de dedo de zinc que se enlazan a secuencias de ADN específicas, por ejemplo, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,140,081 y 7,067,617L; y las Solicitudes de Patente Publicadas de los Estados Unidos 20060078880, 20040224385 y 20070213269. Una persona experta en el campo puede asociar los polipéptidos de dedo de zinc diseñados con un dominio represor transcripcional (por ejemplo, un dominio KRAB (caja asociada de Krüppel)). Los ejemplos de estas moléculas y técnicas se describen en Beerli *et al.*, (Proc Natl Acad Sci USA. 2000 97(4):1495-1500) y la Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos 20070020627. En algunas realizaciones de la invención, una célula hospedante se transduciría con un vector que expresa el represor transcripcional. Este planteamiento tiene una ventaja sobre la desactivación del gen de interés utilizando la recombinación homóloga debido a que, en la mayoría de los casos, una célula hospedante será diploide y sería deseable desactivar ambas copias de gen. Mientras que, la expresión de un represor transcripcional deberá reprimir la expresión de ambas copias de gen.

La expresión de una proteína endógena particular también se puede reducir utilizando compuestos que reducirán directa o indirectamente la expresión de la proteína endógena particular. Utilizando el fB como un ejemplo, se pueden utilizar varios compuestos para reducir la expresión de fB endógena. Por ejemplo, se ha mostrado que la expresión de proteínas

de fB es inhibida por histamina (Falus & Meretey, *Immunology* 1987 60:547-551 y Falus & Meretey, *Mol Immunol* 1988 25(11):1093-97), butirato de sodio (Andoh *et al. Clin Exp Immuno* 1999 118:23-29), un glucocorticoide tal como dexametasona (Dauchel *et al. Eur J Immunol* 1990 20(8):1669-75), factor de crecimiento derivado de plaquetas (Circolo *et al. 1990 The Journal of Biol Chem* 265(9):5066-5071), factor de crecimiento epidérmico (Circolo *et al. 1990*), y factor de crecimiento de fibroblastos (Circolo *et al. 1990*). Una célula hospedante de la invención se puede cultivar en presencia de cualquiera de o una combinación de esas moléculas para reducir la expresión endógena de una proteína del factor B del complemento. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, una célula hospedante que expresa un análogo de proteína del factor B del complemento se cultiva en presencia de cualquiera de uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en histamina, butirato de sodio, un glucocorticoide (por ejemplo, dexametasona), un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento epidérmico o un factor de crecimiento de fibroblastos.

Se ha mostrado que varios compuestos y proteínas regulan por incremento o mantienen la expresión de una proteína del factor B del complemento. Por ejemplo, se ha mostrado que la expresión de proteínas del factor B del complemento es regulada por incremento o mantenida por el factor de necrosis tumoral (TNF) (Andoh *et al. Clin Exp Immuno* 1999 118:23-29), estrógeno (Sheng-Hsiang *et al. Biology of Reproduction* 2002 66:322-332), Interleucina-1 (Dauchel *et al. Eur J Immunol* 1990 20(8):1669-75), dexametasona (Lappin & Whaley, *Biochem J* 1991 280:117-123), prednisolona (Lappin & Whaley 1991), cortisol (Lappin & Whaley 1991) e Interferón-gamma (Huang *et al. 2001 Eur J Immunol* 31:3676-3686). Una célula hospedante de la invención se puede cultivar en ausencia de cualquiera de o una combinación de esas moléculas para reducir la expresión endógena de una proteína del factor B del complemento. Adicionalmente, una célula hospedante se puede cultivar en presencia de un inhibidor de cualquiera de uno o más de esos compuestos. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, una célula hospedante que expresa un análogo de proteína del factor B del complemento se cultiva en presencia de cualquiera de uno o más compuestos que inhiben un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un TNF, estrógeno, interleucina-1, dexametasona, prednisolona, cortisol e interferón-gamma. En algunas realizaciones, la expresión por parte de la célula hospedante de uno o más de esos compuestos se reduce, por ejemplo, utilizando procedimientos descritos en este documento. Los ejemplos de inhibidores de estrógeno incluyen, pero no están limitados a, tamoxifeno. Los inhibidores también incluyen anticuerpos que se enlazan y reducen la actividad del compuesto. Por ejemplo, varios anticuerpos que se enlazan e inactivan el TNF son conocidos en el campo.

Un análogo de proteína del factor B del complemento que contiene una composición preparada a partir de células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutafinidad, purificación de flujo tangencial, diafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad con heparina y sefarosa y otras formas conocidas de separación y concentración. Después de cualquier paso de purificación preliminar, una mezcla que comprende un análogo de proteína del factor B del complemento y contaminantes, si existen, se puede someter a la cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH, por ejemplo, utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, en algunos casos realizado en concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal) u otros procedimientos para la purificación adicional.

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención está por lo menos 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, por lo menos 99,5% o por lo menos 99,9% puro en relación con la proteína total.

La invención también proporciona procedimientos para producir un análogo de proteína del factor B del complemento que comprenden expresar en una célula un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención y purificar el análogo de proteína del factor B del complemento.

#### Afecciones/Enfermedades Mediadas por el Complemento

Existen tres vías de activación del complemento, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de lectina (Figuras 1A y 1B). En este documento se describen ejemplos de análogos de proteína del factor B del complemento de la invención. En algunas realizaciones, estos análogos de proteína del factor B del complemento pueden atenuar la vía alternativa de activación del complemento. Sin embargo, con base en la manera en la cual se intersectan las tres vías del complemento, estos análogos pueden disminuir la inflamación causada por cualquiera de las tres vías del complemento y pueden proporcionar de ese modo una terapia para cualquier enfermedad cuya etiología implique, por lo menos en parte, la activación del complemento. Estas incluyen, pero no están limitadas a, AMD temprana, AMD húmeda y atrofia geográfica. Las Figuras 1A y 1B describen en términos generales las vías del complemento. Se debe observar que se intersectan en C3b.

En el presente documento se describen procedimientos para tratar una enfermedad mediada por el complemento que comprenden administrar a un paciente una preparación farmacéutica de la invención, un análogo del factor B del complemento de la invención o un ácido nucleico o vector que codifica un análogo del factor B del complemento de la invención. Los procedimientos para inhibir la actividad del complemento pueden comprender administrar a un sujeto humano un análogo del factor B del complemento humano, mutado en una cantidad suficiente para inhibir una vía del complemento al competir con el enlace del factor B del complemento nativo en el sujeto, en donde el análogo del factor B del complemento humano mutado es un análogo del factor B del complemento activo de la SEQ ID NO: 4 que tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces de disulfuro y un aminoácido de cisteína libre que ha sido sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina. En algunas realizaciones, el análogo del factor B del complemento mutado comprende las SEQ ID NOs: 2, 3, 22 o 23.

Los procedimientos para inhibir la actividad del complemento pueden comprender introducir a un sitio de la actividad del complemento un análogo del factor B del complemento de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector viral de la invención, una composición/preparación farmacéutica de la invención, o cualquier combinación de los mismos en una cantidad suficiente para inhibir la actividad del complemento. En algunas realizaciones, un procedimiento utiliza un factor B del complemento el cual es un análogo de la SEQ ID NO: 4 que tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces de disulfuro y un aminoácido de cisteína libre que ha sido sustituido por otro aminoácido.

Los procedimientos para inhibir la actividad del complemento pueden comprender introducir a un sitio de la actividad del complemento un análogo del factor B del complemento humano mutado en una cantidad suficiente para inhibir la actividad del complemento debido a que el análogo del factor B del complemento humano, mutado compite con el enlace del factor B del complemento nativo, en donde el análogo del factor B del complemento humano mutado es un análogo del factor B del complemento activo de la SEQ ID NO: 4 que tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces de disulfuro y un aminoácido de cisteína libre que ha sido sustituido por un aminoácido. En algunas realizaciones, este procedimiento utiliza un análogo del factor B del complemento que comprende los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22 o los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23.

Las vías del complemento son una parte del sistema inmune conocida como el sistema inmune innato que proporciona una protección inmediata de una infección antes de la activación de las ramificaciones humorales y mediadas por células del sistema inmune. Son activadas y desactivadas a través de reacciones en cascada que exhiben una cinética de orden superior pero son bien reguladas notablemente. La vía alternativa del complemento, en particular, ha evolucionado para circular con gran rapidez a través de un bucle de retroalimentación positivo.

Los análogos de proteína del factor B del complemento de la invención y/o los vectores que los expresan se pueden utilizar ventajosamente para la administración local y/o sistémica a un mamífero y/o para tratar enfermedades crónicas. En algunas realizaciones de la invención, un análogo del factor B del complemento inhibe una vía del complemento al competir con el enlace del factor B del complemento nativo, por ejemplo, a la proteína de C3b y/o la proteína del factor D. Esto puede permitir la atenuación de la actividad del complemento a diferencia del bloqueo completo de la vía. Por lo tanto, puede ser posible regular por decremento la actividad del complemento a un nivel que sea terapéutico (por ejemplo, alivia algunos síntomas o su gravedad) sin bloquear completamente la actividad del complemento. Evitando o disminuyendo de esta manera los riesgos asociados con el bloqueo de la actividad del complemento, tal como un riesgo incrementado de infección. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad mediada por el complemento (por ejemplo, una enfermedad crónica) mediante la administración local o sistémica (por ejemplo, i.v., intraperitoneal u oral) de un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para modular, regular, inhibir y/o incrementar una actividad del complemento. Las vías relacionadas con el complemento incluyen, pero no están limitadas a, las vías clásica, de lectina y alternativa del complemento. En algunos casos, una vía relacionada con el complemento puede desempeñar un papel en una afección, enfermedad o enfermedades particulares. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar, disminuir la velocidad del progreso de y/o tratar un estado de enfermedad mediado por una o más vías relacionadas con el complemento mediante la administración de un análogo del factor B del complemento de la invención o un ácido nucleico o vector que codifica un análogo del factor B del complemento de la invención. Estos estados de enfermedad o afecciones incluyen, pero no están limitados a, formación de drusas, degeneración macular, AMD, ojo seco, úlceras corneales, aterosclerosis, retinopatía diabética, vitreoretinopatía (Grisanti *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:2711-2717), inflamación corneal, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedades relacionadas con el sistema inmune, enfermedades relacionadas con la autoinmunidad, lupus nefritis, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), enfermedades reumatológicas, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, lesión intestinal y renal posterior a la isquemia y reperfusión, asma, síndrome hemolítico-urémico atípico,



glomerulonefritis membranoproliferativa Tipo II, glomerulonefritis no proliferativa, pérdida del feto (por ejemplo, pérdida espontánea del feto), glaucoma, uveítis, hipertensión ocular, lesión cerebral (por ejemplo, lesión traumática cerebral), apoplejía (por ejemplo, véase Arumugam *et al.*, PNAS 93(12):5872-6 (1996)), daño postraumático de órganos, trauma térmico (por ejemplo, lesión por quemadura) daño pos-infarto de órganos (por ejemplo, cardíaco, neurológico), vasculitis, enfermedad de Kawasaki, angioedema hereditario (HAE), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH, algunas veces referida como síndrome de Marchiafava-Micheli), colitis, enfermedad inflamatoria del intestino, metástasis tumoral, lesión por reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, rechazo de trasplante (por ejemplo, xenógeno y alo), infecciones, sepsis, choque séptico, síndrome de Sjögren, miastenia grave, enfermedades de la piel mediadas por anticuerpos, todas las enfermedades específicas de órganos mediadas por anticuerpos (que incluyen diabetes mellitus Tipo I y Tipo II, tiroiditis, púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica y neuropatías), síndrome de resistencia a la insulina (por ejemplo, véase Weyer *et al.*, (2000) Diabetes Care, 23(6):779-785), diabetes gestacional, esclerosis múltiple, psoriasis, lesión de derivación (bypass) cardiopulmonar, poliarteritis nodosa, púrpura de Henoch Schonlein, enfermedad del suero, enfermedad de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, glomerulonefritis pos-estreptocócica, fibrosis pulmonar idiopática (neumonitis intersticial usual), glomerulonefritis membranosa, miocarditis (por ejemplo, miocarditis autoinmune) (Kaya *et al.* Nat. Immunol 2001;2(8):739-45), infarto de miocardio, distrofia muscular (por ejemplo, asociada con deficiencia de distrofina), síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, reperfusión y/o una enfermedad mediada por el complemento.

En algunas realizaciones, una enfermedad mediada por el complemento es una enfermedad de los ojos. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento o una composición farmacéutica se administra al ojo, por ejemplo, mediante una inyección intravítrea, inyección subretinal, inyección a la cámara intra-anterior del ojo, inyección o aplicación local a la córnea, inyección subconjuntiva, inyección sub-tenon o mediante colirio. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se administra a los ojos, en donde la composición farmacéutica comprende por lo menos un análogo del factor B del complemento, por ejemplo, seleccionado del grupo de hfB3-292S (SEQ ID NO: 2), hfB3-292S-740N (SEQ ID NO: 3), hfB3-292S-Fc (SEQ ID NO: 22) y hfB3-292S-740N-Fc (SEQ ID NO: 23).

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa más común de visión disminuida en individuos de más de 65 años de edad en el mundo desarrollado. La AMD seca se caracteriza por una degeneración progresiva de la mácula lo que causa pérdida visual del campo central. Una AMD debilitante más aguda incluye la neovascularización florida y la extravasación en la retina, conocida como AMD húmeda. Actualmente no existe una terapia efectiva para la AMD.

Una característica de la AMD es la acumulación de drusas, localizadas entre la lámina basal del epitelio pigmentario retinal (RPE) y la capa interna de la membrana de Bruch (Pauleikhoff *et al.* 1990 Am J. Ophthalmol 109, 38-43; Bressler *et al.* 1990 Arch. Ophthalmol. 108, 1442-1447). Se cree que las drusas, así como también otros cambios relacionados con la edad que ocurren cerca de la membrana de Bruch, contribuyen a la disfunción y degradación del RPE y la retina al inducir isquemia, así como también al restringir el intercambio de nutrientes y productos de desecho entre la retina y la coroides (revisado por Bird, 1992 Pathophysiology of AMD. In *Age-Related Macular Degeneration: Principles and Practice* (Hampton, G., and Nelsen, P.T., eds.) Capítulo 3, Raven Press, Nueva York). Varios estudios han indicado procesos mediados por el sistema inmune en el desarrollo de la AMD. En forma digna de consideración, los autoanticuerpos se detectaron en los sueros de pacientes con AMD (Penfold *et al.*, 1990 Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 228, 270-274), como se predijo por la hipótesis respecto a que los procesos mediados por el sistema inmune e inflamatorio están involucrados en el desarrollo y/o eliminación de drusas.

La formación de drusas en los ojos se puede asociar con varias enfermedades tal como la degeneración macular. En algunos casos, se ha implicado que la formación de drusas y/o su asociación con una enfermedad está relacionada con la actividad del complemento. Algunas realizaciones de la invención proporcionan composiciones y procedimientos para modular, regular, inhibir, reducir, retardar y/o invertir la formación o crecimiento de drusas en un animal, tal como un humano. Por ejemplo, las composiciones o moléculas de la invención se pueden suministrar a drusas (por ejemplo, mediante la inyección directa en las drusas (inyección intradrusas), adyacente a las drusas o inyección intravítrea). Algunas realizaciones de la invención se pueden utilizar para disminuir la velocidad del progreso de la degeneración macular, posiblemente al inhibir la formación de drusas. La vitronectina, un componente abundante de las drusas, también es un componente de depósitos extracelulares asociados con la aterosclerosis (Niculescu *et al.*, 1989 Atherosclerosis, 78, 197-203), amiloidosis (Dahlback *et al.*, 1993 J. Invest. Dermatol. 100, 166-170), elastosis (Dahlback *et al.*, 1988 Acta Derm. Venereol. 68, 107-115) y MPGN tipo II (Jansen *et al.*, 1993 Am. J. Pathol. 143, 1356-1365). La vitronectina es una proteína multifuncional que funciona en la adhesión de células, mantenimiento de hemostasis e inhibición de lisis de células inducida por el complemento (Preissner, 1991 Ann. Rev. Cell. Biol. 7, 275-310). Adicionalmente, las placas ateroscleróticas comparten una variedad de otros constituyentes con las drusas, tal como componentes del complemento y apolipoproteína E. Una asociación entre la AMD avanzada y la aterosclerosis de arterias carótidas se reportó en un estudio epidemiológico (Vingerling *et al.*, 1995 Am. J. Epidemiol. 142, 404-409) y otro estudio identificó una correlación significativa entre la degeneración elástica de la dermis no expuesta al sol y

neovascularización coroidal en pacientes con AMD (Blumenkranz *et al.*, 1986 *Ophthalmology*, 93, 552-558). Finalmente, el péptido amiloide  $\beta$ , un constituyente principal de placas neuríticas en la enfermedad de Alzheimer, también se encuentra en las drusas (Johnson *et al.*, 2002 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 99, 11830-11835). El péptido amiloide  $\beta$  ha sido implicado como un activador principal del complemento (Bradt *et al.*, 1998 *J. Exp. Med.* 188, 431-438).

Un análisis comprensivo de la composición molecular de las drusas humanas, así como también de las células de RPE que flanquean o yacen encima de las drusas, demostró una inmunorreactividad a inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento que están asociados con la deposición de complejos inmunes (Johnson *et al.*, 2000. *Exp. Eye Res.* 70, 441-449). Las drusas también contienen proteínas multifuncionales tal como vitronectina (Hageman *et al.*, 1999 *FASEB J.* 13, 477-484) y apolipoproteína E (Anderson *et al.*, 2001 *Am. J. Ophthalmol.* 131, 767-781) que desempeñan un papel en la modulación del sistema inmune. Además, las moléculas involucradas en la respuesta en fase aguda a la inflamación, tal como el componente amiloide P y la  $\alpha_1$ -antitripsina, también han sido identificadas en las drusas (Mullins *et al.*, 2000 *The FASEB Journal*, 14, 835-846), así como también proteínas involucradas en la coagulación y la fibrinólisis (factor X, trombina y fibrinógeno) (Mullins *et al.*, 2000 *The FASEB Journal*, 14, 835-846). Se sugirió que la formación de drusas y la patología de RPE asociada contribuyen a una respuesta inflamatoria crónica que activa la cascada del complemento (Hageman *et al.*, 2001 *Prog. Retin, Eye Res.* 20, 705-732; Johnson *et al.*, 2001 *Exp. Eye Res.* 73, 887-896).

Otra forma de un trastorno óptico que surge a partir de la AMD y que da por resultado alteraciones de la retina es la atrofia geográfica, la cual conduce a la muerte de parches de células de bastones y conos, así como también de las células del RPE.

Se ha mostrado que la aterosclerosis involucra habitualmente vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Niculescu *et al.* *Immunologic Research*, 30(1):73-80(8) (2004) y Niculescu y Horea, *Immunologic Research* 30(1):73-80 (2004). La activación del complemento y la deposición de C5b-9 ocurren habitualmente en la aterosclerosis tanto en humanos como experimental. El C5b-9 puede ser responsable de la lisis de células y el ensamble sublítico de C5b-9 induce la activación y proliferación de células de músculo liso (SMC) y células endoteliales (EC). La deficiencia de C6 del complemento tiene un efecto protector sobre la aterosclerosis inducida por la dieta, lo que sugiere que el ensamble de C5b-9 se requiere para, o por lo menos desempeña un papel significativo, en el progreso de lesiones ateroscleróticas, por ejemplo, véase Niculescu y Horea *Immunologic Research* 30(1):73-80 (2004). Algunas realizaciones de la invención se pueden utilizar para inhibir la formación de C5b-9 y/o inhibir la aterosclerosis. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención se administra a un sitio o un sitio potencial de aterosclerosis. Este análogo de proteína del factor B del complemento inhibe una vía (por ejemplo, la vía clásica y/o alternativa del complemento) lo cual a su vez inhibe la formación o activación de C5b-9 u otra vía del complemento relacionada con un compuesto involucrado en la aterosclerosis. Puede haber otras proteínas relacionadas con el complemento que estén involucradas en la aterosclerosis cuya formación y/o activación puede ser inhibida o bloqueada de una manera similar.

La hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) es característica de varias enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, asma (por ejemplo, asma alérgico). Se ha mostrado que la AHR involucra habitualmente las vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Taube *et al.*, 2006 *PNAS* 103(21):8084-8089; Park *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169:726-732, (2004); Thurman y Holers, *J Immunology* 176:1305-1310 (2006) y Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20050260198. Park *et al.* mostraron que la Crry-Ig administrada mediante una inyección intraperitoneal tuvo un efecto sobre la AHR. Algunas realizaciones de la invención proporcionan composiciones y procedimientos para modular, regular, inhibir y/o reducir la AHR en un animal, tal como un humano. Las enfermedades específicas relacionadas con la AHR que pueden ser tratadas, aliviadas, inhibidas y/o mejoradas incluyen, pero no están limitadas a, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía de hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, broncoectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoide, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hiper-eosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducido por el ejercicio, asma inducido por la contaminación, asma con predominio de tos, enfermedad pulmonar parasitaria, infección por virus sincitial respiratorio (RSV), infección por virus de parainfluenza (PIV), infección por rinovirus (RV), virus de Hantaan (por ejemplo, cepa de cuatro esquinas) e infección por adenovirus.

Se ha mostrado que las enfermedades relacionadas con el sistema inmune tales como las enfermedades relacionadas con el sistema autoinmune, enfermedades inflamatorias asociadas con HLA-B27, lupus nefritis y lupus eritematoso sistémico (SLE) involucran habitualmente vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Thurman y Holers, *J Immunology* 176:1305-1310 (2006). La lupus nefritis es una complicación de la SLE. Está relacionada con el proceso autoinmune de lupus, donde el sistema inmune produce anticuerpos (anticuerpo antinuclear y otros) contra componentes del cuerpo. Los complejos de esos anticuerpos y componentes del complemento se acumulan habitualmente en los

riñones y dan por resultado una respuesta inflamatoria. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar una enfermedad relacionada con el sistema inmune, por ejemplo, que involucra o está relacionada con una vía del complemento, tal como SLE.

5

Se ha mostrado que la artritis involucra habitualmente vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Thurman y Holers, *J Immunology* 176:1305-1310 (2006) y Banda *et al.* *J Immunol.* 177(3):1904-1912 (2006). La vía alternativa del complemento desempeña un papel significativo en la inducción de artritis y la vía alternativa del complemento aún puede ser requerida. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la artritis, por ejemplo, artritis reumatoide o artritis inflamatoria.

10

La hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) una enfermedad de la sangre que potencialmente pone en peligro la vida caracterizada por anemia hemolítica intravascular inducida por el complemento y trombosis debido a la destrucción intravascular de glóbulos rojos (RBCs) por el complemento dando por resultado la amplificación descontrolada del sistema del complemento que conduce a la destrucción de la membrana de RBC. Las personas con esta enfermedad tienen habitualmente células sanguíneas que les falta un gen llamado PIG-A. Este gen permite que una sustancia, llamada glicosil-fosfatidilinositol (GPI) ayude a ciertas proteínas a adherirse a las células. Sin el PIG-A, las proteínas reguladoras del complemento no pueden conectarse a la superficie de las células y proteger a las células del complemento. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la hemoglobinuria paroxística nocturna.

15

20

El angioedema hereditario (HAE) es una afección genética que potencialmente pone en peligro la vida la cual es causada habitualmente por una deficiencia del inhibidor de C1, una proteína del sistema del complemento. Los síntomas incluyen episodios de edema (hinchamiento) en varias partes del cuerpo que incluyen las manos, pies, cara y vías respiratorias. El angioedema hereditario (HAE) existe en tres formas, todas las cuales son causadas por una mutación genética que es heredada en una forma dominante autosómica. Los tipos I y II son causados por mutaciones en el gen SERPING1, lo cual da por resultado ya sea niveles disminuidos o formas disfuncionales de la proteína inhibidora de C1 (HAE tipo I). El HAE tipo III ha sido vinculado con mutaciones en el gen F12, el cual codifica el Factor XII de proteína de coagulación. Todas las formas de HAE conducen a una activación anormal del sistema del complemento. Algunos tratamientos actuales incluyen Ecallantida un inhibidor peptídico de calicreína (por ejemplo, véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20070213275), Icatibant (Firazyr, Jerini) el cual es un antagonista selectivo de receptores de bradiquinina y Cinryze<sup>MR</sup> (ViroPharma, Inc.) un inhibidor de C1 esterasa. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la hemoglobinuria paroxística nocturna.

25

30

35

El glaucoma es un grupo de enfermedades del nervio óptico que involucran la pérdida de células ganglionares retinianas en un patrón característico de una neuropatía óptica. Aproximadamente 25% de pacientes con glaucoma que tienen pérdida de células ganglionares retinianas tienen una presión ocular normal. La hipertensión ocular (OHT) es un factor de riesgo significativo para desarrollar glaucoma y disminuirlo por vía de productos farmacéuticos o cirugía es actualmente la base del tratamiento del glaucoma. Se ha mostrado que la hipertensión ocular y el glaucoma involucran habitualmente las vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Khalyfa *et al.*, *Molecular Vision*, 13:293-308 (2007); Stasi *et al.* *IOVS* 47(3):1024-1029 (2007); y Kuehn *et al.*, *Experimental Eye Research* 83:620-628 (2006). Se ha mostrado que la expresión y/o la presencia de C1q y C3 son más altas en la retina sujeta a la OHT. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar el glaucoma.

40

45

Se ha mostrado que la uveítis está asociada habitualmente con la vía del complemento, por ejemplo, véase Mondino y Rao, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 24:380-384 (1983) y Jha *et al.* *Molecular Immunology* 44:3901-3908 (2007). Mondino y Rao descubrieron que los valores principales de todos los componentes del complemento sometidos a prueba en el humor acuoso para mediciones en suero se incrementaron en pacientes con un historial de cirugías oculares previas y fueron más altos en pacientes con uveítis anterior. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la uveítis.

50

La retinopatía diabética es una de las causas principales de pérdida de visión en individuos de mediana edad. Se cree que la activación del sistema del complemento desempeña un papel importante en la patogénesis en la retinopatía diabética (por ejemplo, véase Jha *et al.* *Molecular Immunology* 44:3901-3908 (2007)). Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la retinopatía diabética.

55

60

La vitreoretinopatía proliferativa (PV) es una de las complicaciones más comunes del desprendimiento de retina. La PV

ha sido vinculada con la actividad del complemento, por ejemplo, véase Grisante *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 1991;32(10):2711-7 y Grisante *et al.* Ophthalmologe. 1992;89(1):50-4. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la PV.

5 Se ha mostrado que el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, lesión intestinal y renal posterior a la isquemia y reperfusión I/R, síndrome hemolítico-urémico atípico, glomerulonefritis membranoproliferativa Tipo II y pérdida del feto (por ejemplo, pérdida espontánea del feto), involucran habitualmente vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Thurman y Holers, J Immunology 176:1305-1310 (2006).

10 Se ha mostrado que la lesión cerebral (por ejemplo, lesión traumática cerebral) involucra habitualmente vías relacionadas con el complemento, por ejemplo, véase Leinhase *et al.*, J Neuroinflammation 4:13 (2007) y BMC Neurosci. 7:55(2006). Leinhase 2006 mostró que después de una lesión traumática cerebral experimental en ratones (fB+/+) de tipo salvaje, hubo una activación sistémica del complemento dependiente del tiempo. En contraste, el grado de activación sistémica del complemento se atenuó significativamente en ratones fB-/. Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la muerte de neuronas, lesión traumática neural (por ejemplo, cerebro), neuroinflamación y/o neuropatología mediada por el complemento.

20 La lesión por isquemia-reperfusión puede causar incrementos en la producción de o la oxidación de varios compuestos potencialmente peligrosos que son producidos por células y tejidos, lo cual puede conducir a un daño oxidante a o la muerte de células y tejidos. Por ejemplo, la lesión renal posterior a la isquemia y reperfusión puede dar por resultado un daño histológico a los riñones, que incluye el daño tubular renal y cambios característicos de la necrosis tubular aguda. La disfunción renal resultante permite la acumulación de desechos nitrogenados que son excretados ordinariamente por los riñones, tal como nitrógeno ureico en el suero (SUN). La isquemia-reperfusión también puede causar una lesión en órganos distantes, tal como los pulmones. Algunas realizaciones de la invención utilizan moduladores, tales como inhibidores, de una vía del complemento (por ejemplo, inhibidores de la actividad del factor B), por ejemplo, cuando se administran a un animal que tiene, o está en riesgo de experimentar o desarrollar, isquemia-reperfusión. En algunas realizaciones, estos moduladores, impiden, reducen o inhiben por lo menos un síntoma de la lesión debido a la isquemia-reperfusión. Otros tipos de lesión por isquemia-reperfusión, que se pueden prevenir o reducir utilizando procedimientos y composiciones de la invención incluyen, pero no están limitados a, lesión cardíaca por isquemia-reperfusión tal como infarto de miocardio o cirugía de derivación (bypass) coronaria, lesión por isquemia-reperfusión del sistema nervioso central, lesión por isquemia-reperfusión de las extremidades o dedos, isquemia-reperfusión de órganos internos tal como los pulmones, hígado o intestino o lesión por isquemia-reperfusión de cualquier órgano o tejido trasplantado. Véase, por ejemplo, la Publicación del PCT No. WO03/061765 la cual plantea el infarto de miocardio y las vías del complemento.

35 La inflamación es un determinante etiológico principal del infarto de miocardio (Ridker, 2007 Nutr. Rev. 65(12 Pt 2):S253-9). También se ha mostrado que el suministro (por ejemplo, intracoronario) de células (madre) de médula ósea conduce a un mejoramiento en la función sistólica después del infarto de miocardio agudo (Wollert, 2008, Curr. Opin. Pharmacol. Jan 31 [Epub]). También, las células madre de médula ósea pueden regenerar el miocardio infartado (Orlic *et al.* 2003 Pediatr. Transplant. 7 Suppl 3:86-88). Se ha mostrado que las células madre de mesenquima proporcionan un efecto protector del corazón en la enfermedad cardíaca isquémica (Guo *et al.* 2007 Inflammation 30(3-4):97-104). En la presente invención, el suministro de las células madre puede ser por cualquier medio, tal como una inyección intracoronaria, una inyección directamente en el miocardio (por ejemplo, en el miocardio enfermo y/o saludable (por ejemplo, adyacente al área lesionada)). En algunas realizaciones, un mamífero es tratado con citocinas para movilizar sus células madre de médula ósea en la circulación permitiendo que las células madre transiten al infarto de miocardio.

50 Varias células madre han sido utilizadas *in vivo* para varias aplicaciones. Un problema con el uso de las células madre *in vivo* es la supervivencia y/o sembrado más bajo de lo deseado de las células madre, por ejemplo, en el área de interés. Una razón significativa para la siembra y supervivencia baja de las células madre puede ser la inflamación en el sitio. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento y/o un procedimiento para mejorar la supervivencia y/o sembrado de células madre. En algunas realizaciones, estos procedimientos comprenden administrar una composición de la invención antes, durante y/o después de la administración o movilización de células madre. En algunas realizaciones, los inhibidores del complemento de la invención actúan como agentes anti-inflamatorios que crearán un ambiente favorable para que las células madre se hospeden en y sobrevivan en el área del sembrado deseado (por ejemplo, corazón dañado o médula ósea) y por lo tanto reparen o reemplacen el tejido dañado. Las células madre se pueden administrar en una solución que también contiene un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención. Las células madre pueden ser, pero no están limitadas a, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre del mesenquima, células madre neurales, células madre de glándulas mamarias, células madre olfativas, células madre de islotes pancreáticos, células madre totipotentes, células madre multipotentes o células madre pluripotentes. Las células madre pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas.

60

La actividad del complemento parece estar involucrada en la distrofia muscular (por ejemplo, asociada con la deficiencia de distrofina). Por ejemplo, véase la Publicación del PCT No. WO2007130031, Spuler & Engel 1998 *Neurology* 50:41-46, y Selcen *et al.* 2001 *Neurology* 56:1472-1481. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la distrofia muscular.

5

La actividad del complemento puede contribuir a la inflamación de la córnea. Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos y composiciones para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la inflamación de la córnea, por ejemplo, después de la cirugía. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento de la invención se administra por *vía* de colirio o como se describe de otra manera en este documento.

10

En algunas realizaciones, los análogos del factor B del complemento de la invención se utilizan para regular, modificar, curar, inhibir, prevenir, mejorar y/o tratar la neovascularización de la córnea.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan procedimientos para incrementar la eficacia del injerto de derivación (bypass) o angioplastia de arterias post-coronarias o periféricas. En algunas realizaciones, un vector de la invención que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención (por ejemplo, hfB3-292S o hfB3-292S-740N) se utiliza para transducir células de un vaso sanguíneo (por ejemplo, células endoteliales). En algunas realizaciones, las células de un vaso sanguíneo son transducidas antes del implante en un animal. En algunas realizaciones, las células de un vaso sanguíneo se transducen *in vivo*.

15

20

El alivio del dolor y sufrimiento e inflamación en pacientes posoperatorios es un área de interés especial de la medicina clínica, especialmente con el número creciente de operaciones en pacientes externos realizadas cada año. Los análogos del factor B del complemento de la presente invención se pueden utilizar para inhibir la inflamación, por ejemplo, al inhibir una actividad del complemento. Por lo tanto, los análogos del factor B del complemento se pueden utilizar para reducir la inflamación, por ejemplo, en pacientes posoperatorios. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento se administra localmente (por ejemplo, suministro perioperatorio) a un sitio de cirugía para inhibir la inflamación, lo cual en algunos casos reducirá el dolor y sufrimiento. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento se administra en una solución, por ejemplo, en un fluido portador de electrolitos fisiológicos. En algunas realizaciones, un análogo del factor B del complemento se suministra por *vía* de un suministro perioperatorio directamente a un sitio quirúrgico de una solución de irrigación que contiene la composición. En algunas realizaciones, debido al procedimiento de suministro perioperatorio, local de la presente invención, se puede lograr un efecto terapéutico deseado con dosis más bajas de agentes que aquellas necesarias cuando se emplean otros procedimientos de suministro, tales como intravenoso, intramuscular, subcutáneo y oral. En algunas realizaciones, cuando se utiliza por la ruta perioperatoria, la solución dará por resultado una disminución clínicamente significativa en el dolor y/o inflamación del sitio de la operación, permitiendo de ese modo una disminución en el requerimiento de analgésicos (por ejemplo, opiáceos) posoperatorios del paciente y, donde sea apropiado, permitiendo una movilización anticipada del paciente del sitio operatorio. En algunas realizaciones, no se requiere un esfuerzo adicional por parte del cirujano o el personal de la sala de operaciones para utilizar la presente solución en relación con fluidos de irrigación convencionales. En algunas realizaciones, una composición de la invención se utiliza (por ejemplo, en un fluido de irrigación) para la artroscopia, procedimientos terapéuticos y de diagnóstico cardiovasculares y vasculares generales, procedimientos urológicos, heridas quirúrgicas generales y heridas en general. Las composiciones de la invención se pueden suministrar mediante, pero no están limitadas a, una inyección (por ejemplo, por *vía* de una jeringa), por *vía* de fluido de irrigación, como parte de un vendaje sobre una herida o en una aplicación tópica tal como una solución, crema, gel o similares.

25

30

35

40

45

En algunas realizaciones de la invención, un análogo del factor B del complemento y/o un vector de la invención se administra en combinación con un factor inhibidor del complemento, antes de, concurrentemente con o después de la administración del análogo y/o vector del factor B del complemento. Un factor inhibidor del complemento incluye, pero no está limitado a, un Factor H, un Factor 1 similar a H, un MCP, un DAF o una forma soluble de un MCP.

50

En algunas realizaciones de la invención, un análogo o vector del factor B del complemento de la invención se administra en combinación con un factor anti-angiogénico. Los factores anti-angiogénicos incluyen, pero no están limitados a, endostatina, una molécula de enlace a VEGF, PEDF, T2-TrpRS (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 7.273.844), sFLT (por ejemplo, véase Kong *et al.* *Hum Gene Ther* (1998) 9:823-833), aflibercept (VEGF Trap), VEGF Trap-eye<sup>MR</sup>, kininostatina, ranibizumab y bevacizumab.

55

En algunas realizaciones, un análogo y/o vector del factor B del complemento de la invención se administra en combinación con LUCENTIS<sup>MR</sup> (ranibizumab), AVASTIN<sup>MR</sup> (bevacizumab), VEGF Trap-eye<sup>MR</sup>, aflibercept o una(s) molécula(s) que se enlaza(n) a VEGF y/o que inhibe(n) la angiogénesis. LUCENTIS<sup>MR</sup> se utiliza para tratar la AMD húmeda. Algunas realizaciones de la invención también se pueden utilizar para tratar la AMD húmeda. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones para tratar la AMD húmeda que comprenden administrar, por separado o conjuntamente, una composición de la invención en combinación con LUCENTIS<sup>MR</sup>

60

(ranibizumab), AVASTIN<sup>MR</sup> (Bevacizumab) VEGF Trap-eye<sup>MR</sup>, aflibercept y/o una(s) molécula(s) que se enlaza(n) a VEGF y/o que inhibe(n) la angiogénesis. Adicionalmente, la inflamación intraocular es una de las reacciones adversas más comunes reportadas después de la administración de LUCENTIS<sup>MR</sup>, por ejemplo, véase la "Información de Prescripción Completa" para LUCENTIS<sup>MR</sup>. La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir o reducir la inflamación intraocular (por ejemplo, que resulta de la administración de LUCENTIS<sup>MR</sup>) que comprende administrar una molécula o composición de la invención antes de, al mismo tiempo que y/o después de la administración de LUCENTIS<sup>MR</sup>, VEGF Trap-eye<sup>MR</sup> o aflibercept.

En algunas realizaciones de la invención, un análogo o vector del factor B del complemento de la invención se administra en combinación con otro(s) compuesto(s), tal como un compuesto que inhibe la activación de células T, células B, TNF, interleucina-1 (por ejemplo, interleucina-1b), interleucina-6 y/o interferón-gamma. Un análogo o vector del factor B del complemento de la invención también se puede administrar en combinación con un(unos) compuesto(s) que inhibe(n) la actividad del complemento, por ejemplo, actividad alternativa del complemento. Los compuestos que se pueden utilizar y los cuales inhiben el TNF incluyen, pero no están limitados a, compuestos que se enlazan al TNF, tales como anticuerpos (por ejemplo, Infliximab (REMICADE<sup>MR</sup>), Golimumab (SIMPONI<sup>MR</sup>) y Adalimumab (HUMIRA<sup>MR</sup>)) o receptores solubles que se enlazan al TNF tal como Etanercept (ENBREL<sup>MR</sup>). Otros compuestos que se pueden utilizar y los cuales inhiben la activación de células T incluyen, pero no están limitados a, compuestos que se enlazan a B7 tal como abatacept (ORENCIA<sup>MR</sup>). También se pueden utilizar compuestos los cuales regulan por decrecimiento las células B que incluyen, pero no están limitados a, compuestos los cuales se enlazan a CD20 tal como Rituximab (RITUXAN<sup>MR</sup>) y MABTHERA<sup>MR</sup>.

Las vías del complemento que contribuyen a y/o que causan una enfermedad se pueden modular, regular, inhibir y/o activar utilizando varios procedimientos y/o análogos de proteína del factor B del complemento que son parte de la presente invención.

#### Composiciones, Formulaciones y Preparaciones

Algunas realizaciones de la invención proporcionan composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas que contienen un análogo del factor B del complemento de la invención, tal como para usos terapéuticos. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un análogo del factor B del complemento que comprende los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22 o aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23, por ejemplo, hfB3-292S (SEQ ID NO: 2), hfB3-292S-740N (SEQ ID NO: 3), hfB3-292S-Fc (SEQ ID NO: 22) o hfB3-292S-740N-Fc (SEQ ID NO: 23). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un análogo del factor B del complemento que consiste de los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22 o los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23. Los ejemplos de composiciones y formulaciones farmacéuticas que se pueden utilizar con los análogos del factor B del complemento de la invención se describen en la Publicación del PCT No. WO08/106644 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665.

Algunas realizaciones de la invención incluyen preparaciones farmacéuticas que comprenden un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención, un ácido nucleico de la invención, un vector viral de la invención o cualquier combinación de los mismos.

Las formulaciones (por ejemplo, para inyección) son generalmente, pero no necesariamente, soluciones biocompatibles del ingrediente activo, por ejemplo, que comprenden solución de Hank o solución de Ringer. Las formulaciones para la administración transdérmica o transmucosa incluyen generalmente, pero no están limitadas a, sustancias penetrantes tales como ácido fusídico o sales biliares en combinación con detergentes o agentes tensoactivos. En algunas realizaciones, las formulaciones se pueden fabricar como aerosoles, supositorios o parches. En algunas realizaciones, la administración oral puede no estar favorecida para ingredientes activos de proteínas o peptídicos; sin embargo, este tipo de composición se puede formular adecuadamente, por ejemplo, en una forma con revestimiento entérico, en un depósito, en una cápsula y así por el estilo, con el fin de que esté protegida de las enzimas digestivas, de modo que la administración oral también se puede emplear. Algunas formulaciones de la invención comprenden una solución salina balanceada (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, Texas) o una solución salina balanceada plus (Alcon Laboratories, Inc.). En algunas realizaciones, una formulación comprende uno o más de los siguientes: citrato, NaCl (por ejemplo, 0,64%), cloruro de potasio (KCl) (por ejemplo, 0,075%), dihidrato de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) (por ejemplo, 0,048%), hexahidrato de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) (por ejemplo, 0,03%), trihidrato de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O) (por ejemplo, 0,39%), dihidrato de citrato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O) (por ejemplo, 0,17%), sacarosa e hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH) y agua. La lista precedente incluye algunas moléculas que se listan como hidratos particulares, por ejemplo, dihidrato, trihidrato, hexahidrato, etcétera. Se entiende que varios hidratos de estos compuestos se pueden utilizar en la presente invención y la invención no está limitada a estas formas de hidratos particulares de las moléculas listadas. En algunas realizaciones, una formulación comprende uno o más de

los siguientes: NaCl, monohidrato de fosfato monobásico, heptahidrato de fosfato de sodio dibásico y ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para ajustar el pH y agua. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende por lo menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste de histidina, MgCl<sub>2</sub>, trehalosa, un polisorbato, polisorbato 20, NaCl, sacarosa, arginina y prolina. En algunas realizaciones, una formulación comprende uno o más de los siguientes: histidina (por ejemplo, aproximadamente 10 mM); deshidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa (por ejemplo, aproximadamente 10% o aproximadamente 50 mM); MgCl<sub>2</sub> (por ejemplo, aproximadamente 10 mM); un polisorbato tal como polisorbato 20 (por ejemplo, aproximadamente 0,01%); y NaCl (por ejemplo, aproximadamente 0,1%). En algunas realizaciones, una formulación puede comprender uno o más de los siguientes: sacarosa, arginina o prolina. En algunas realizaciones, una formulación comprende o consiste de una(s) molécula(s) de la presente invención, histidina 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, trehalosa 50 mM y 0,01% de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una formulación comprende o consiste de una(s) molécula(s) de la presente invención, 1,0% de NaCl y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. En algunas realizaciones, una formulación comprende o consiste de una(s) molécula(s) de la presente invención, y una solución de sal balanceada enriquecida con bicarbonato, dextrosa y glutatona, tal como BSS PLUS<sup>MR</sup>. En algunas realizaciones, una formulación no comprende trehalosa. En algunas realizaciones, una formulación o composición está a un pH de aproximadamente 5,5. En algunas realizaciones, una formulación o composición está a un pH de entre aproximadamente 5,0 a 9,0, de aproximadamente 5,0 a 5,5, de aproximadamente 5,3 a 5,7, de aproximadamente 5,5 a 6,0, de aproximadamente 5,8 a 6,2, de aproximadamente 6,0 a 6,5, de aproximadamente 6,3 a 6,7, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 6,8 a 7,2, de aproximadamente 7,0 a 7,5, de aproximadamente 7,3 a 7,7, de aproximadamente 7,5 a 8,0, de aproximadamente 7,8 a 8,2, de aproximadamente 8,0 a 8,5, de aproximadamente 8,3 a 8,7 y de aproximadamente 8,5 a 9,0, cualquiera que sea adecuado para retener la actividad biológica y estabilidad del(los) ingrediente(s) activo(s).

Algunas formulaciones de la invención se pueden fabricar como aerosoles, supositorios, colirio o parches.

Los ejemplos de formulaciones adecuadas y procedimientos de formulación para un modo deseado de administración se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Co., Easton, PA y en la Patente de los Estados Unidos No. 7.208.577.

En algunas realizaciones, una composición para el uso *in vivo* contiene un "portador" o un "portador farmacéuticamente aceptable". El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el vector de interés. El término "portador" incluye, pero no está limitado a, un material ya sea sólido o líquido, el cual puede ser orgánico o inorgánico y de origen sintético o natural, con el cual un(unos) componente(s) activo(s) de la composición se mezcla(n) o se formula(n) para facilitar la administración a un sujeto.

En general, un(unos) aceite(s) adecuado(s), solución salina, dextrosa acuosa (glucosa) y soluciones de azúcar y glicoles relacionados tales como propilenglicol o polietilenglicoles son portadores adecuados habitualmente para soluciones parenterales. En algunas realizaciones, las soluciones para la administración parenteral contienen una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizadores adecuados y si es deseable o necesario, sustancias tampónas. Los agentes antioxidantes tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico, ya sea solos o combinados, se pueden utilizar como agentes estabilizadores. También se utiliza ácido cítrico y sus sales y EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservadores, tal como cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y clorobutanol.

Los portadores pueden incluir carbohidratos tales como trehalosa, manitol, glutatona, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para el uso en las formulaciones pueden incluir, por ejemplo, DPPC (1,2-Didecanoil-*sn*-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DSPC (1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina) y DOPC (1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina). Se pueden utilizar surfactantes naturales o sintéticos. El polietilenglicol se puede utilizar (incluso además de su uso en la derivatización de una proteína). Se pueden utilizar dextranos, tal como ciclodextrano. En algunas realizaciones, se puede utilizar ciclodextrina, aminos terciarias y/o beta-ciclodextrina. Se pueden utilizar sales biliares y otros potenciadores relacionados. Se pueden utilizar derivados de celulosa y celulosa. Se pueden utilizar aminoácidos, tal como el uso en una formulación tampón. También, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, inclusión de complejos u otros tipos de portadores.

Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, antibióticos, conservadores, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Una composición, si se desea, también puede contener agentes de humedecimiento y/o emulsionantes y/o agentes tampónes de pH. Donde sea necesario, una composición también puede incluir un agente solubilizador y/o un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

También se contempla en este documento el suministro pulmonar de un agente o proteína (o derivado del mismo) de la presente invención. En algunas realizaciones, un(unos) análogo(s) del factor B del complemento se suministra a los

5 pulmones de un mamífero mientras que inhala y puede permanecer en la mayoría de los casos en los pulmones o en algunas realizaciones puede atravesar el recubrimiento epitelial de los pulmones hasta el torrente sanguíneo, (por ejemplo, véase Adjei *et al.*, *Pharmaceutical Research* 7:565-569 (1990); Adjei *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics* 63:135-144 (1990); Braquet *et al.*, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 13(suppl. 5):s.143-146 (1989); Hubbard *et al.*, *Annals of Internal Medicine* 3:206-212 (1989); Smith *et al.*, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (1989); Oswein *et al.*, *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colo., Marzo de 1990; Debs *et al.*, *The Journal of Immunology* 140:3482-3488 (1988) y Platz *et al.*, *Patente de los Estados Unidos No. 5,284,656*). Para el uso en la práctica de esta invención se contempla una amplia variedad de dispositivos mecánicos que están diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen pero no están limitados a nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles que son adecuados para la práctica de algunas realizaciones de la invención son el nebulizador ULTRAVENT<sup>MR</sup>, fabricándose por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.; el nebulizador ACORN II<sup>MR</sup>, fabricándose por Marquest Medical Products, Englewood, Colo.; el inhalador de dosis medidas VENTOLIN<sup>MR</sup>, fabricándose por Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.; y el inhalador de polvo SPINHALER<sup>MR</sup>, fabricándose por Fisons Corp., Bedford, Mass.

20 En algunas realizaciones, una proteína se prepara en forma particulada. En algunas realizaciones, esta forma particulada tiene un tamaño de partícula promedio menor que 10  $\mu\text{m}$  (o micrómetros), más preferiblemente de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , para el suministro al pulmón distal.

25 Las formulaciones adecuadas para el uso con un nebulizador (por ejemplo, de chorro o ultrasónico) comprenderán habitualmente un análogo del factor B del complemento disuelto en agua, en algunas realizaciones, en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de solución. Una formulación también puede incluir un tampón y/o un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización de proteína y la regulación de la presión osmótica). Una formulación para nebulizador también puede contener un surfactante, para reducir o impedir la agregación inducida por la superficie de una(s) proteína(s) causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

30 Las formulaciones para el uso con un dispositivo inhalador de dosis medidas comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene un análogo del factor B del complemento de la invención suspendido en un gas propelente, por ejemplo, con la ayuda de un surfactante. Un gas propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarbono, hidrocloreofluorocarbono, hidrofurocarbono o hidrocarbono, que incluyen triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los surfactantes adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soya. Un ácido oleico también puede ser útil como un surfactante. En algunas realizaciones, las formulaciones para el suministro desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene un análogo del factor B del complemento de la invención y también pueden incluir un agente de carga, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol en cantidades las cuales facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, de 50 a 90% en peso de la formulación.

#### 40 Administración y Suministro

45 Se debe entender que cuando se plantea la introducción o administración de un ácido nucleico que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento, la invención también contempla la introducción o administración del análogo de proteína del factor B del complemento mismo. Se entiende que cuando se plantea la introducción de un análogo del factor B del complemento, la invención también contempla la introducción de un ácido nucleico que codifica el análogo de proteína del factor B del complemento.

50 En algunas realizaciones, los análogos o composiciones del factor B del complemento de la invención se pueden administrar por la ruta local o sistémica. Las rutas de administración útiles se describen en este documento y son conocidas en el campo. Los procedimientos de introducción o administración incluyen, pero no están limitados a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intratraqueal, tópica, mediante la inhalación, transdérmica, rectal, rutas parenterales, epidural, intracraneal, dentro del cerebro, intraventricular, subdural, intraarticular, intratecal, intracardiaca, intracoronaria, intravítrea, subretinal, en la cámara intra-anterior del ojo, particularmente de manera local en la córnea, subconjuntiva, mediante una inyección subtenón, mediante la aplicación de colirio, rutas orales, por *vía* de un catéter de balón, por *vía* de una cánula o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una composición o un análogo del factor B del complemento de la invención se administra a drusas, por ejemplo, mediante la inyección directamente en las drusas. La administración sistémica puede ser, pero no está limitada a, mediante una inyección intravenosa o intra-arterial o mediante el suministro transmucosa, subcutáneo y/o transdérmico. En algunas realizaciones, una composición de la invención se puede dirigir inicialmente a un sitio diferente de un sitio enfermo. Por ejemplo con respecto a la AHR la cual ocurre en los pulmones de un animal, una



inyección intraperitoneal de una proteína, vector o ácido nucleico de la invención puede dar por resultado un cambio en la AHR en los pulmones, por ejemplo, véase Park *et al.*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 169:726-732, (2004). En algunas realizaciones, un nivel de dosificación y/o un modo de administración de una composición pueden depender del carácter de la composición, el carácter de una(s) afección(es) que se trata(n) y/o un historial de un paciente individual. En algunas realizaciones, se administran células que expresan un análogo del factor B del complemento. Estas células pueden ser una línea de células, xenotróficas, alogénicas o autólogas.

En algunas realizaciones, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, un análogo o vector de proteína del factor B del complemento de la invención se administra aproximadamente una vez a la semana, mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, año, 18 meses, 2 años, 30 meses, 3 años, 5 años, 10 años o como sea necesario. En algunas realizaciones, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, una molécula o vector de la invención se administra de aproximadamente cada 1 a 4 semanas, aproximadamente cada 4 a 8 semanas, aproximadamente cada 1 a 4 meses, aproximadamente cada 3 a 6 meses, aproximadamente cada 4 a 8 meses, aproximadamente cada 6 a 12 meses, aproximadamente cada 9 a 15 meses, aproximadamente cada 12 a 18 meses, aproximadamente cada 15 a 21 meses, aproximadamente cada 18 a 24 meses, aproximadamente cada 1 a 2 años, aproximadamente cada 1,5 a 3 años, aproximadamente cada 2 a 4 años, aproximadamente cada 3 a 5 años, aproximadamente cada 5 a 7 años, aproximadamente cada 7 a 10 años o aproximadamente cada 10 a 20 años. Se espera que la administración de un vector que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento sería menos frecuente que la administración del análogo de proteína del factor B del complemento. En algunas realizaciones de la invención, una preparación farmacéutica comprende un vector que codifica un análogo del factor B del complemento de la invención y la preparación farmacéutica se administra solo una vez al paciente.

En algunas realizaciones, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, un vector que codifica un análogo del factor B del complemento se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces a un paciente en toda su vida. En algunas realizaciones, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, un vector lentiviral de la invención se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces a un paciente en toda su vida.

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención se administra por medio de una inyección intravítrea al ojo humano. En algunas realizaciones, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 500 µg; de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 900 µg; de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 700 µg; de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 mg; o aproximadamente 500 µg de un análogo de proteína del factor B del complemento se administra por medio de una inyección intravítrea al ojo humano.

En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención se administra por medio de una inyección subretinal o inyección intravítrea de un vector lentiviral o viral adeno-asociado (AAV). En algunas realizaciones, de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^7$  a aproximadamente  $5 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $3 \times 10^7$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$ ; aproximadamente  $2,5 \times 10^7$ ; aproximadamente  $5 \times 10^7$ ; aproximadamente  $7,5 \times 10^7$ ; o aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades transductoras de un vector lentiviral se administran por medio de una inyección subretinal. En algunas realizaciones, de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $7,5 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $7,5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $6 \times 10^8$  a aproximadamente  $9 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $7 \times 10^8$  a aproximadamente  $8 \times 10^8$ ; aproximadamente  $5 \times 10^8$ ; aproximadamente  $6 \times 10^8$ ; aproximadamente  $7 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $8 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $9 \times 10^8$ ; o aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades transductoras de un vector de AAV se administran por medio de una inyección subretinal.

En algunas realizaciones, de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $5 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $2 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $2 \times 10^9$  a aproximadamente  $5 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $3 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $3 \times 10^9$  a aproximadamente  $6 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $6 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$ ; o de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  unidades transductoras de un vector de AAV se administran por medio de una inyección intravítrea.

En algunas realizaciones, de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 100 µl, de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 75 µl, de aproximadamente 75 µl a aproximadamente 100 µl, de aproximadamente 60 µl a aproximadamente 90 µl, de aproximadamente 70 µl a aproximadamente 80 µl, aproximadamente 50 µl; aproximadamente 60 µl; aproximadamente 70 µl; aproximadamente 80 µl; aproximadamente 90 µl; o aproximadamente 100 µl de un análogo de proteína del factor B del complemento o un vector que codifica un análogo de proteína del factor

B del complemento se inyecta por la ruta subretinal. En algunas realizaciones, de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 1 ml, de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 500 µl, de aproximadamente 500 µl a aproximadamente 1 ml, de aproximadamente 250 µl a aproximadamente 750 µl, de aproximadamente 250 µl a aproximadamente 500 µl, de aproximadamente 500 µl a aproximadamente 750 µl, de aproximadamente 400 µl a aproximadamente 600 µl o de aproximadamente 750 µl a aproximadamente 1 ml de un análogo de proteína del factor B del complemento o un vector que codifica un análogo de proteína del factor B del complemento se inyecta por la ruta intravítrea.

En algunas realizaciones, un anti-inflamatorio se puede suministrar en combinación con un análogo de proteína del factor B del complemento (por ejemplo, hfB3-292S o hfB3-292S-740N), vector o ácido nucleico de la invención. Un anti-inflamatorio se puede suministrar antes de, concurrentemente con y/o después de la administración de una molécula o vector de la invención. En algunas realizaciones, un anti-inflamatorio se administra en la misma solución y/o misma jeringa que un análogo, ácido nucleico o vector de proteína del factor B del complemento de la invención. En algunas realizaciones, un análogo o vector de proteína del factor B del complemento de la invención y un anti-inflamatorio se co-administran a los ojos, por ejemplo, como se describe en este documento.

Muchos fármacos anti-inflamatorios se conocen en el campo e incluyen, pero no están limitados a, dexametasona, metasulfobenzato sódico de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, fluorometolona, bromfenaco, pranoprofeno, RESTASIS<sup>MR</sup>, emulsión oftálmica de ciclosporina, naproxeno, glucocorticoides, ketorolaco, ibuprofeno, tolmetina, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, fármacos anti-inflamatorios esteroideos, diclofenaco, flurbiprofeno, indometacina y suprofeno.

Algunas realizaciones de la invención incluyen la administración tanto de un análogo de proteína del factor B del complemento como de un vector que lo codifica. Un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención se puede suministrar antes de, concurrentemente con y/o después de la administración de un vector de la invención. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención se administra en la misma solución y/o misma jeringa que un vector de la invención. En algunas realizaciones, un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención y un vector de la invención se co-administran a los ojos, por ejemplo, como se describe en este documento.

Adicionalmente, un análogo del factor B del complemento o un ácido nucleico que lo codifica se puede suministrar o administrar a un animal por vía de una célula, por ejemplo, como una terapia celular. Por ejemplo, esto se puede realizar al administrar o suministrar una(s) célula(s) que expresa(n) un(unos) análogo(s) del factor B del complemento. En algunas realizaciones, un(unos) análogo(s) del factor B del complemento se expresa(n) de la célula por vía de un promotor regulable, inducible y/o reprimible. En algunas realizaciones, las células encapsuladas que expresan un(unos) análogo(s) del factor B del complemento se suministran a un animal, por ejemplo, véase la Publicación del PCT No. WO07078922 relacionada con células encapsuladas. En algunas realizaciones, las células se administran localmente (por ejemplo, en una articulación, por la ruta intravítrea, intrarretinal, intracraneal, etcétera) o sistémicamente (por ejemplo, i.v.).

Las células que se administran a un animal pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas. En algunas realizaciones, las células autólogas se manipulan *ex vivo* para causar que produzcan un análogo de proteína del factor B del complemento de la invención y, en algunas realizaciones, las células se introducen nuevamente al animal. La transferencia de un ácido nucleico comprendido de una región de codificación a las células *ex vivo* puede ser por medio de cualquier procedimiento, tal como la electroporación, microinyección, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, lipofección, bombardeo de micropartículas, transfección mediada por fosfato de calcio, infección viral y así por el estilo. Opcionalmente, un marcador seleccionable también se puede introducir en las células. Si se utiliza un marcador seleccionable, las células entonces se pueden colocar bajo selección, por ejemplo, para incrementar la expresión y/o para aislar aquellas células que expresan la región de codificación transferida (véase, por ejemplo, Loeffler & Behr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618 (1993); Cohen *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:618-644 (1993); y Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92 (1985)).

Las células recombinantes (por ejemplo, células autólogas o alogénicas transducidas *in vitro*) se pueden suministrar a un paciente por medio de varios procedimientos conocidos en el campo. Por ejemplo, las células se pueden encapsular antes de la administración, como se sabe en el campo. En algunas realizaciones, cuando se encapsulan, las células no son autólogas. En algunas realizaciones, las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre y/o progenitoras hematopoyéticas) se administran por la ruta intravenosa. En algunas realizaciones, las células oculares y/o células pluripotenciales se pueden inyectar directamente en los ojos. La cantidad de células necesarias depende del efecto deseado, el estado del animal, etcétera.

En algunas realizaciones de la invención, un sistema de suministro de genes puede dar por resultado la transducción y/o integración estable de un gen o región de codificación para un análogo del factor B del complemento en una célula objetivo. En algunas realizaciones, las células objetivo son células de mamífero tales como células de primate y células de humano. En algunas realizaciones, las células objetivo son células de los ojos, tal como células epiteliales, pigmentarias, retinales, células retinales o células pluripotenciales. Las células objetivo pueden estar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En algunas realizaciones, una célula objetivo es una célula madre. Las células madre incluyen, pero no están limitadas a, células madre pluripotentes, células madre totipotentes, células madre hematopoyéticas, células madre cancerosas y células madre embrionarias. En algunas realizaciones, las células pluripotenciales que están contempladas en este documento no son aquellas para propagar una entidad viva a partir de un cigoto o blastómero. La presente invención también contempla el uso de una célula parcialmente no diferenciada para el implante en los ojos de un paciente necesitado de tratamiento, por ejemplo, para regenerar células de los ojos.

#### Animales Transgénicos

Algunas realizaciones de la invención proporcionan un animal transgénico (por ejemplo, no humano) que expresa un análogo del factor B del complemento de la invención. Los procedimientos para hacer un animal transgénico son conocidos en el campo. En alguna realización, un animal transgénico (tal como un ratón) también comprenderá una mutación, supresión o disrupción del gen Fas, por ejemplo, véase Macmicking *et al.* Cell. 81:641-650 (1995).

#### **EJEMPLOS**

La invención ahora se describe con referencia a los siguientes ejemplos. Esos ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustración únicamente y de ninguna manera se deberá interpretar que la invención está limitada a esos ejemplos sino que preferiblemente se deberá interpretar que comprende cualquiera y la totalidad de variaciones que lleguen a ser evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

Mientras que en este documento se han descrito realizaciones particulares de la invención con propósitos de descripción, aquellas personas expertas en el campo apreciarán que se pueden hacer numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones anexas.

#### **Ejemplo 1. Generación de una Construcción de Expresión de hfB3**

Se diseñó un plásmido para incluir la secuencia de codificación para el hfB3 humano con un marcador seleccionable IRES-Neo (hfB3-IRES-Neo). El plásmido fue sintetizado por GENEART AG (Regensburg, Alemania, plásmido), honorarios para una organización de contratación de servicios. Un sitio de restricción Nhe I se incorporó en los extremos tanto 5' como 3' de la secuencia de codificación. La secuencia de codificación de ácido nucleico de hfB3 se optimizó con codones para la expresión óptima en células de mamífero.

El plásmido de expresión de genes, pCI (Promega, Madison, WI), se modificó. En primer lugar, la poliA de BGH (Hormona de Crecimiento de Bovino) se retiró del pCI y se reemplazó por una poliA sintética. Después, la secuencia de codificación de hfB3 con un marcador seleccionable (hfB3-IRES-Neo) se cortó por medio de Nhe I de un plásmido y se clonó en el sitio de Sal I del pCI modificado como una ligadura con extremos romos para crear una construcción de expresión de hfB3. El plásmido se secuenció en su totalidad para confirmar la integridad de secuencia de la construcción (SEQ ID NO: 5).

#### **Ejemplo 2. Generación de una Construcción de Expresión de hfB3-292S**

Se introdujo una modificación adicional a la proteína de hfB3. La proteína del factor B de tipo salvaje humano y la proteína de hfB3 tienen 23 aminoácidos de cisteína (C), lo que sugiere que hay por lo menos una cisteína libre no apareada que está presente en la proteína. El mapeo de enlaces de disulfuro sugirió que la C libre en el hfB3 biológicamente activo se localiza en el aminoácido 292. La C en la posición 292 está sumamente conservada en la proteína del factor B entre diferentes especies (Tabla 1, anterior). En este Ejemplo, esta C en la posición 292 se cambia a serina (S), generando el hfB3-292S.

Para crear la construcción de expresión de hfB3-292S, la mutación específica para un sitio se introdujo en la construcción de expresión de hfB3 (SEQ ID NO: 5).

La construcción de expresión de hfB3 se utilizó como la plantilla para hacer la mutación de un sitio que cambia la C en la posición 292 a S utilizando el Equipo de Mutagénesis Dirigida a un Sitio de Stratagene de acuerdo con las instrucciones de fabricación, creando la construcción de expresión de hfB3-292S. Se utilizaron dos cebadores: Cebador directo 5'-CACCGGCGCCAAGAAGAGCCTGGTCAACCTGATC-3' (SEQ ID NO: 6) y Cebador inverso 5'-

GATCAGGTTGACCAGGCTCTTCTTGGCGCCGGTG-3' (SEQ ID NO: 7). Los nucleótidos subrayados indican el aminoácido mutado de C a S. El casete de expresión de hfB3-292S incluye, de 5' a 3', un promotor de CMV, un intrón quimérico, una secuencia de codificación optimizada con codones para hfB3-292S, un marcador seleccionable IRES-Neo y una poliA sintética (Figura 2). La construcción completa se secuenció para confirmar la mutación y la integridad de la construcción (SEQ ID NO: 8). La secuencia de aminoácidos esperada para el hfB3-292S se muestra en la SEQ ID NO: 2.

### Ejemplo 3. Generación de Líneas de Células de Expresión de hfB3 y hfB3-292S Estables

Se generaron líneas de células estables que expresaba la proteína hfB3 o hfB3-292S al transfectar células 293 FreeStyle (Invitrogen, No. de Cat. R79007) con la construcción de expresión de hfB3 o hfB3-292S. La transfección de ADN plásmido en las células 293 FreeStyle fue mediada por una transfección basada en PEI (Polietilenimina, Sigma, No. de Cat. 23966). Una solución de PEI se preparó en agua estéril a una concentración final de 1 mg/ml. El pH se ajustó a 7,0 con HCl 5 N. La solución se esterilizó utilizando un filtro de 0,22 µm. Las alícuotas de la PEI se almacenaron congeladas a -80°C hasta el uso.

El protocolo de transfección fue de la siguiente manera:

Un día antes de la transfección, las células se sembraron a  $1 \times 10^6$  células/ml en Medio de Expresión de 293F libre de suero (Invitrogen, No. de Cat. 12338-018).

El día siguiente, las células se lavaron con medio RPMI1640 basal (Invitrogen, No. de Cat. 22400-089) complementado únicamente con Suplemento Ht (No. de Cat. 11067-030, Invitrogen), resuspendido en el mismo medio a  $2 \times 10^6$  células/ml y suministrado en una placa nueva de 6 pocillos con 1 ml en cada pocillo.

Las soluciones madre de ADN y PEI se prepararon en NaCl estéril 150 mM de la siguiente manera: 2,5 µg de ADN de construcción de expresión de hfB3 o hfB3-292S (en 2,5 µL) se diluyeron en 47,5 µL de NaCl 150 mM y se mezclaron con pipeteo (solución de ADN). Diez microlitros (10 µL) de solución de PEI se diluyeron en 40 µL de NaCl 150 mM, seguido por un vórtice suave (solución de PEI). Las soluciones de ADN y PEI se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La solución de PEI a continuación se agregó a la solución de ADN y la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos adicionales y a continuación la mezcla de ADN/PEI se agregó a las células en la placa de 6 pocillos y las células se incubaron con agitación (200 RPM) durante 5 horas a 37°C en una incubadora con 8% de CO<sub>2</sub> y 85% de humedad. Después de 5 horas, 1,1 ml de Medio de Expresión 293F completo (sin aditivos) se agregó a cada uno de los pocillos y la incubación continuó durante 72 horas.

Las células a continuación se recolectaron, se lavaron una vez con Medio de Expresión 293F y se colocaron en Medio de Expresión 293F nuevo que contenía 300 µg/ml de G418 (Teknova). Como control negativo, un número igual de células naturales 293F no transfectadas se cultivó en el mismo medio que contenía G418. Las células estuvieron bajo selección de G418 durante aproximadamente 3 semanas. Tiempo en el cual murieron las células no transfectadas en el medio que contenía G418. Las células transfectadas se pasaron sobre un gradiente de FICOL (Sigma) para retirar las células muertas o moribundas de la población viva resistente a G418. La población viva resistentes a G418 se expandió adicionalmente durante un período de aproximadamente 2 semanas, durante el cual las células se centrifugaron cada 2-3 días y se resuspendieron en Medio de Expresión 293F nuevo que contenía 300 µg/ml de G418.

### Ejemplo 4. Producción de hfB3 y hfB3-292S

Las células productoras de hfB3 o hfB3-292S resistentes a G418 se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en el Medio de Expresión 293F ya sea en placas de 6 pocillos con 2 ml de cultivo en cada pocillo, en matraces para centrifugador de 500 ml con 100 ml de cultivo en cada matraz o en matraces para centrifugador de 3.000 ml con 1.000 ml de cultivo en cada matraz. Las células se incubaron durante 72 horas con agitación a 100 rpm en un agitador orbital en una incubadora a 37°C con 8% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad.

El sobrenadante de medio de cultivo de células que contenía proteína hfB3 o proteína hfB3-292S entonces se recolectó y se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos para aclarar los restos de células después de lo cual el medio de cultivo se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

### Ejemplo 5. Cuantificación de Proteínas hfB3 y hfB3-292S

Se desarrolló un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) para la cuantificación de hfB3 y hfB3-292S con el factor B de tipo salvaje humano, estándar. El ensayo fue un inmunoensayo de emparedado basado en la tecnología de ECL de BioVeris. En resumen, el ensayo de ECL se formateó como un emparedado de placas de 96 pocillos, un paso y sin

ensayo de lavado. Las muestras de control de calidad (factor B purificado de plasma humano, Quidel, No. de Cat. A408) y las muestras de prueba se incubaron con un reactivo de mezcla maestra que contenía un anticuerpo monoclonal anti-hfB biotinilado (anticuerpo monoclonal anti-factor B de humano, R & D Systems, No. de Cat. MAB2739), y un anticuerpo policlonal anti-hfB etiquetado con BV-TAG plus (anticuerpo policlonal anti-factor B de humano, R & D Systems, No. de Cat. AF2739) y perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. La mezcla se incubó durante 150 minutos. Después de la incubación, una solución de detención (Tampón de Borato, 250 mM, pH 9,2 que contenía cloruro de sodio 500 mM y 1,6 mg/ml de BSA) se agregó y a continuación la placa se leyó en un Analizador M1MR. El intervalo dinámico estimado para el ensayo fue de 9,0 a 950 ng/ml.

#### 10 **Ejemplo 6. Análisis por inmunotransferencia Western para hfB3 y hfB3-292S**

La electroforesis en poliacrilamida de la proteína hfB3 y la proteína hfB3-292S bajo condiciones desnaturalizantes pero no reductoras (SDS-PAGE) se realizó al mezclar muestras de proteína hfB3 o proteína hfB3-292S con un tampón de muestra de proteína no reductor (Pierce). La proteína del factor B de humano purificada del plasma (100 ng por muestra, Quidel) se utilizó como control positivo. Cada gel también contenía un pocillo con marcadores de peso molecular de proteína pre-teñidos (15 µL/carril) (Invitrogen). Las muestras y los marcadores se calentaron a 95°C durante 5 minutos en tampón de muestra de proteínas no reductor. Las muestras se cargaron en un mini-gel Prefabricado de 7,5% de Tris-HCL (Bio-Rad). El gel se condujo (Tampón de Conducción de SDS/Tris/Glicina 10 X, Bio-Rad) a 75 V durante 15 minutos o hasta que la parte frontal del tinte pasó a través del gel de apilamiento dentro del gel de resolución. Una vez que la parte frontal del tinte entró al gel de resolución, el voltaje se incrementó a 100 V y la electroforesis continuó hasta que la parte frontal del tinte escapó del gel.

El análisis de inmunotransferencia Western se realizó al lavar y equilibrar el gel en tampón de transferencia (Tampón de Transferencia Tris/Glicina 10 X, Bio-Rad) durante 20 minutos mientras se balanceaba suavemente. Una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y papel secante también se equilibraron en el tampón de transferencia. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente sobre una membrana de nitrocelulosa utilizando un dispositivo Trans Blot Semi-Transfer Cell<sup>MR</sup> (Bio-Rad) (20 V durante 45 minutos). Una vez que se completó la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de caseína 1X (Vector Laboratories) durante por lo menos una hora a temperatura ambiente con agitación suave en un balancín. La membrana se sondeó con un anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal contra el factor B de humano, R&D Systems, No. de Cat. MAB2739) diluido a 1:10,000 en solución de caseína 1X a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave y se lavó en 10 ml de solución de caseína 1X 3 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave en un balancín. La membrana se incubó con IgG anti-ratón de cabra biotinilada (anticuerpo secundario, R&D Systems, No. de Cat. BAF007), diluida a 1:20,000 en solución de caseína 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave en un balancín y se lavó en 10 ml de solución de caseína 1X 3 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se incubó en reactivo Vectastain ABC-Amp<sup>MR</sup> (Vector Laboratories) en 20 ml de solución de caseína 1X durante 45 minutos que contenía 40 µL de Reactivo A y 40 µL de Reactivo B. La membrana se lavó en 10 ml de solución de caseína 1X 3 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave.

Para adquirir la señal de quimioluminiscencia de las inmunotransferencias Western, las membranas se equilibraron en 20 ml de Tris 0,1 M pH 9,5 durante 5 minutos sin agitación. El exceso de tampón se retiró de la membrana al mantener verticalmente la membrana y tocar el borde de la membrana con un paño Kimwipe<sup>MR</sup>. El lado objetivo de la membrana se colocó orientado hacia arriba en un nuevo recipiente. El Substrato Duolox<sup>MR</sup> (7 ml, Vector Laboratories) se colocó directamente sobre el lado objetivo de la membrana la cual se incubó durante 5 minutos en la oscuridad. El exceso de Duolox<sup>MR</sup> se retiró de la membrana al mantener verticalmente la membrana y tocar el borde de la membrana con un paño Kimwipe<sup>MR</sup>. La membrana se lavó al sumergirla en 20 ml de Tris 0,1 M pH 9,5 durante 5 minutos con agitación en la oscuridad. El exceso de tampón se retiró de la membrana al mantener verticalmente la membrana y tocar el borde de la membrana con un paño Kimwipe<sup>MR</sup>. La membrana se colocó en una hoja de envoltura de plástico, doblada y se expuso a una película de rayos X Kodak BioMax MS<sup>MR</sup> en un casete de película durante 1 a 5 minutos. La película se colocó en una solución Kodak Developer<sup>MR</sup> (diluir 26 ml de la solución Developer<sup>MR</sup> en 92 ml de ddH<sub>2</sub>O) durante 1 minuto. La película se retiró de la solución Developer<sup>MR</sup> y se colocó en solución Kodak Fixer<sup>MR</sup> (diluir 26 ml de la solución Fixer en 92 ml de ddH<sub>2</sub>O) durante 1 minuto. Finalmente, la película se enjuagó con agua de la llave y se dejó secar a temperatura ambiente.

Como se muestra en la Figura 3, las células que producían hfB3 y hfB3-292S resistentes a G418 produjeron, en el medio de cultivo de células, la proteína hfB3 (Carril 3) y la proteína hfB3-292S (Carril 4) al tamaño apropiado (aproximadamente 100 KDa). Estas proteínas emigraron a aproximadamente a la misma velocidad que el factor B de humano de tipo salvaje purificado de plasma humano (Carril 2). No se detectó una banda visible en el medio de cultivo de células no transfectadas (control negativo) lo que indica la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-factor B de humano (Carril 1). De manera interesante, los presuntos agregados a aproximadamente 200-260 KDa se detectaron fácilmente en

muestras de hfb3 (Carril 3), mientras que no se detectaron agregados en las muestras de hfb3-292S (Carril 4) producidas bajo las mismas condiciones experimentales. Los agregados pudieron ser causados por poblaciones dobladas incorrectamente de hfb3 en el medio de cultivo de células. Cuando las proteínas se doblaron incorrectamente, expusieron regiones hidrófobas que son propensas a la formación de agregados a través de interacciones hidrófobas-hidrófobas. Estos datos sugieren que en la preparación de proteína hfb3-292S, el doblado incorrecto ya sea se eliminó o se redujo significativamente en comparación con la proteína hfb3.

#### **Ejemplo 7. Ensayo de Actividad Hemolítica de la Vía Alternativa del Complemento**

La actividad de la vía alternativa del complemento humano se puede medir utilizando un ensayo hemolítico como se describe en este Ejemplo.

Un mililitro (1 ml) de suspensión de eritrocitos de conejo (rRBCs) (Lampire Biological Laboratory, No. de Cat. 7246408) se lavó con tampón de  $Mg^{2+}$ -EGTA frío hecho recientemente. Los eritrocitos se transfirieron a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml, se agregaron 30 ml de tampón de  $Mg^{2+}$ -EGTA y las células se mezclaron suavemente. Los rRBCs se aglomeraron en una centrifuga Beckman Allegra 6KR<sup>MR</sup> a 1,200 rpm a 4°C sin desacelerar durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de  $Mg^{2+}$ -EGTA. Este paso de lavado se repitió dos veces. Los rRBCs se resuspendieron en 2 ml de tampón de  $Mg^{2+}$ -EGTA helado y un conteo de células se obtuvo utilizando un hemocitómetro.

La mezcla de reacción de actividad hemolítica se estableció en placas de 96 pocillos con fondo en forma de V colocada sobre hielo. Para determinar si la proteína hfb3 o la proteína hfb3-292S puede competir con la proteína del factor B de humano de tipo salvaje y puede inhibir su actividad hemolítica, se estableció un ensayo de competencia en un volumen total de 40  $\mu$ L que incluía 500 ng de factor B de humano de tipo salvaje, incrementando las cantidades de proteína hfb3 o proteína hfb3-292S y tampón de GVB<sup>++</sup> (Sigma, No. de Cat. G6415). Cincuenta microlitros (50  $\mu$ L) de suero humano agotado de factor B diluido 25 veces con tampón de  $Mg^{2+}$ -EGTA se agregaron a cada pocillo, seguido por 10  $\mu$ L de  $5 \times 10^7$  rRBCs lavados con  $Mg^{2+}$ -EGTA. Después de la adición de los rRBCs, cada muestra se mezcló suavemente en la placa de 96 pocillos utilizando una pipeta de múltiples canales.

La placa de 96 pocillos se colocó en una bandeja de vidrio con una capa de agua a 37°C sumergiendo el fondo de la placa. La bandeja a continuación se colocó en un baño de agua a 37°C con agitación orbital a 110 rpm durante 40 minutos. Después de la incubación, la placa se colocó sobre hielo, 150  $\mu$ L de solución salina al 0,9% helada se agregaron a cada pocillo y cada reacción se mezcló suavemente mediante el pipeteo para detener la reacción. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 2,000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5810R<sup>MR</sup> durante 5 minutos (min) a 4°C sin desaceleración para aglomerar los rRBCs en el fondo de la placa. El sobrenadante (180  $\mu$ L) se eliminó de cada pocillo sin alterar el pélet y se transfirió al pocillo correspondiente de una nueva placa de 96 pocillos. La absorbancia de cada muestra se midió a 405 nm en un lector de microplacas.

#### **Ejemplo 8. Actividad Biológica de hfb3 y hfb3-292S**

La actividad biológica de la proteína hfb3 y la proteína hfb3-292S se examinó al medir la hemólisis mediada por la vía alternativa del complemento de los rRBCs. El ensayo descrito en el Ejemplo 7 se utilizó para someter a prueba la potencia de la proteína hfb3 o la proteína hfb3-292S en la inhibición de la vía alternativa del complemento humano. Cada reacción se realizó por triplicado. Como se muestra en la Figura 4, el medio de cultivo de células sin procesar de células que producían la proteína hfb3-292S y la proteína hfb3 inhibió/redujo eficientemente la actividad de la vía alternativa del complemento de una manera dependiente de la dosis. Aunque no se desea ser limitado por teoría alguna, la proteína hfb3 y hfb3-292S pueden estar inhibiendo la actividad de la vía alternativa del complemento al competir contra la proteína del factor B de tipo salvaje y/o al secuestrar el C3b y/o el factor D del complemento.

#### **Ejemplo 9. Purificación de proteínas hfb3 y hfb3-292S**

El medio de cultivo de células de una línea de células 293 FreeStyle de humano transfectada y que expresa y secreta de manera estable la proteína hfb3 o la proteína hfb3-292S se utilizó como el material de inicio para la purificación de la proteína hfb3 o la proteína hfb3-292S. La proteína hfb3 o hfb3-292S secretada, soluble se purificó del sobrenadante de cultivo de células mediante una combinación de cromatografía de intercambio aniónico (AEX), interacción hidrófoba (HIC) y exclusión de tamaño (SEC) para los pasos de captura, purificación intermedia y refinamiento, respectivamente, utilizando un Purificador GE AKTA<sup>MR</sup>. Dos esquemas de purificación se describen a continuación. Estos dos esquemas difieren debido a que uno utiliza un paso de cromatografía de HIC y el otro utiliza dos pasos de cromatografía de HIC.

El sobrenadante de cultivo de células que contenía la proteína hfb3 se diluyó con agua destilada a una relación en volumen de 4:1 de sobrenadante de cultivo/agua para disminuir la conductividad a ~8 Milli Siemens por centímetro

(mS/cm) y se ajustó a pH 7,5 con tampón de fosfato 50 mM. Este material se cargó directamente sobre una columna de intercambio iónico pre-empacada (POROS HQ 50, ABI) en un purificador AKTAM<sup>MR</sup> utilizando una bomba P-960 a un caudal de 30 ml por minuto. La columna se equilibró previamente con tampón A (tampón de fosfato (PB) 50 mM, pH 7,5, conductividad ~8 mS/cm) a un caudal lineal de 600 ml/hora (~1 Volumen de Columna/minuto, CV/minuto). El efluente se supervisó mediante la detección de UV a 280 nm. Después del lavado del material no enlazado, el material retenido se eluyó con un gradiente no lineal de tampón A y tampón B (PB 50 mM y NaCl 1 M, pH 7,5) para elevar secuencialmente la conductividad de la fase móvil paso por paso de 8 mS/cm (0% de tampón B por 2 CV), a 33 mS/cm (25% de tampón B por 8 CV) y finalmente a 105 mS/cm (100% de tampón B por 5 CV).

Para facilitar adicionalmente la eliminación de contaminantes de proteína del hospedante, un paso intermedio de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se introdujo, el cual purifica y separa proteínas con base en diferencias en su hidrofobicidad superficial. Las fracciones principales (del paso de cromatografía de AEX) que contenían la proteína hFB3 se acumularon y se ajustaron para contener sulfato de amonio aproximadamente 1,4 M y tampón de fosfato 47 mM, pH 7,5 (conductividad 216 mS/cm) (sulfato de amonio 1,0 M y tampón de fosfato 33,7 mM, pH 7,5, conductividad 169 mS/cm para hFB3-292S) al agregar el tampón C (sulfato de amonio 1,5 M y tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5) a la muestra a una relación de volumen de aproximadamente 30:1 del sulfato de amonio/tampón de fosfato contra la muestra. La muestra acumulada se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se aplicó a una columna de interacción hidrófoba (HiTrap Phenyl HP, GE Healthcare) pre-equilibrada con sulfato de amonio 1,5 M y Tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5 (tampón C) (sulfato de amonio 1,0 M y tampón de fosfato 33,7 mM para hFB<sub>3</sub>-292S) al caudal de 300 ml/hora (1 CV/min). El material retenido se eluyó al disminuir la concentración de sulfato de amonio en una forma no lineal.

Alternativamente, el paso intermedio de cromatografía de HIC se puede reemplazar por una cromatografía de HIC de dos pasos, por ejemplo, para hacer más fácil que el proceso de purificación se mejore. En este proceso de purificación de HIC de dos pasos, la mayoría de proteínas de células hospedantes se separaron de fB3 y fB3-292S por medio de la cromatografía de HIC del primer paso, la selección negativa de HIC, mediante el enlace a la columna de HIC (HiTrap Phenyl HP, GE Healthcare) en una condición baja de sal (sulfato de amonio 0,75 M y tampón de fosfato 25 mM, pH 7,5 para fB3 y sulfato de amonio 0,6 M y tampón de fosfato 20 mM, pH 7,5, conductividad 100 mS/cm para hFB3-292S). La fracción de flujo directo del paso de selección negativa de HIC que contenía la proteína hFB3 o fB3-292S a continuación se reajustó para contener sulfato de amonio aproximadamente 1,5 M y tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5 (conductividad 216 mS/cm) para fB3 o sulfato de amonio 1,0 M y tampón de fosfato 33,7 mM, pH 7,5, (conductividad 169 mS/cm) para hFB3-292S. Para la cromatografía de HIC del segundo paso, la muestra pasó a través de un filtro de 0,2 µm y se aplicó a una columna de interacción hidrófoba (HiTrap Phenyl HP, GE Healthcare) pre-equilibrada con sulfato de amonio 1,5 M y Tampón de fosfato 50 mM, pH 7,5 para fB3 y sulfato de amonio 1,0 M y tampón de fosfato 33,7 mM para hFB<sub>3</sub>-292S al caudal de 300 ml/hora (1 CV/min). El material retenido se eluyó al disminuir la concentración de sulfato de amonio en una forma lineal para separar adicionalmente la proteína fB3 o fB3-292S de las proteínas restantes de la célula hospedante.

Las fracciones que contienen la proteína hFB3 biológicamente activa del paso de cromatografía de HIC se acumularon y se concentraron con un dispositivo de filtro de centrifuga (Millipore, Amicon Ultra, No. de Cat. 901024, Corte de 10,000 PM). La muestra concentrada se sujetó a la cromatografía de exclusión de tamaño en una columna Sephacryl S300 26/60 HR<sup>MR</sup> (volumen máximo de carga: 3% de CV, ~10 ml), equilibrada en tampón de PBS (fosfato 4 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, (GIBCO)). La elución de la proteína hFB3 se realizó a un caudal lineal, constante de 60 cm/hr utilizando PBS, supervisando el efluente mediante la detección de UV a 280 nm. La proteína hFB3 purificada se almacenó a -80°C en alícuotas.

Este procedimiento permitió una separación casi completa de la proteína hFB3 de otros contaminantes. La pureza de la proteína hFB3 después del proceso de cromatografía de tres pasos fue muy alta, como fue indicado por el hecho de que el análisis de tinción de plata de SDS-PAGE de 0,2 µg de proteína hFB3 purificada solo produjo una banda definida, individual (Figura 5A, panel izquierdo). Cuando la proteína hFB3 purificada mediante el proceso de cromatografía de tres pasos anterior se sometió a un ensayo de competencia contra el factor B de tipo salvaje humano en un ensayo hemolítico, suprimió la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humano, demostrando que la proteína hFB3 purificada era biológicamente activa (Figura 5B, panel derecho). Sorprendentemente, dos poblaciones de hFB3 se detectaron mediante la HIC, una era biológicamente activa (designada como Pico I o población activa) y la otra tenía una actividad biológica muy reducida (designada como Pico II o población menos activa) (Figura 6). Estas dos formas se detectaron fácilmente mediante la HPLC de fase inversa (RP-HPLC) en el medio de cultivo de células no procesado de células estables que producían la proteína hFB3 (Figuras 7A y 7B).

#### **Ejemplo 10. La Línea de Células que Produce la Proteína hFB3-292S no Produce la Población del Pico II**

El medio de cultivo de células que producían la proteína hfB3-292S sin procesar que contenía un análogo del factor B del complemento con la cisteína libre sustituida por serina en la posición 292 se sometió al análisis de RP-HPLC con un medio de cultivo de células 293 FreeStyle naturales, sin procesar como control negativo y el medio de cultivo de células que producían la proteína hfB3 sin procesar como control positivo (Figuras 7A y 7B). El medio de cultivo de células que producían la proteína hfB3-292S no produjo ninguna población del Pico II detectable, mientras que el análisis del medio de cultivo de células que producían la proteína hfB3 mostró que 35% del hfB3 era la población menos activa, Pico II. (Figuras 7A y 7B).

**Ejemplo 11. Generación y Caracterización de una Construcción de Expresión de hfB4 y proteína hfB4**

La proteína hfB4 se diseñó para cambiar el ácido aspártico, en el aminoácido 740 en hfB3, a una asparagina. Se piensa que este cambio atenúa o inhibe la función de la serina proteasa de este análogo de proteína del factor B del complemento.

Para crear la construcción de expresión hfB4, la mutación específica para un sitio se introdujo en la construcción de expresión de hfB3.

La construcción de expresión de hfB3 (SEQ ID NO: 5) descrita en el Ejemplo 1 se utilizó como una plantilla para hacer una mutación que cambia el ácido aspártico (D) en la posición 740 en la SEQ ID NO: 4 a asparagina (N) utilizando el Equipo de Mutagénesis Dirigida a un Sitio de Stratagene (Stratagene's, Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones de fabricación, creando la construcción de expresión de hfB4. Se utilizaron dos cebadores: Cebador directo 5'-GTCCCCGCCACGCCCGGAACTTCCACATCAACCTGTTCC-3' (SEQ ID NO: 15) y Cebador inverso 5'-GGAACAGGTTGATGTGGAAGTTCCGGGCGTGGGCGGGGAC-3' (SEQ ID NO: 16). Los nucleótidos subrayados indican el cambio de nucleótido que da por resultado el cambio de aminoácido de D a N. Esta construcción de expresión de hfB4 incluye, de 5' a 3', un promotor de CMV, un intrón quimérico, una secuencia de codificación optimizada con codones para hfB4, un marcador seleccionable IRES-Neo y una poliA sintética. La construcción completa se secuenció para confirmar la mutación y la integridad de la construcción. La secuencia de aminoácidos esperada para hfB4 se muestra en la SEQ ID NO: 17. La única diferencia entre la secuencia de aminoácidos de hfB3 y hfB4 es el cambio D740N.

Una línea de células estable que expresa la proteína hfB4 se generó mediante la transfección mediada por PEI y la selección de fármacos de células 293 como se describe en el Ejemplo 3. La concentración de la proteína hfB4 en el medio de cultivo de células de la población de células seleccionada se midió por medio de ECL como se describe en el Ejemplo 5.

La actividad biológica de la proteína hfB4, purificada como se describe en el Ejemplo 9 utilizando el procedimiento de cromatografía de HIC de un paso, se examinó mediante un ensayo de actividad hemolítica como se describe en el Ejemplo 7. La Tabla 2 muestra la inhibición de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humano por el medio de cultivo de células que contenía la proteína hfB4. La actividad hemolítica relativa se calificó por la hemoglobina liberada después de la hemólisis de rRBC por la actividad de la vía alternativa del complemento humano. Como se muestra en la Tabla 2, la proteína hfB4 inhibió eficientemente la actividad de la vía alternativa del complemento.

**Tabla 2. Inhibición con hfB4 de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humano**

	Control sin wt	Competido con 0,5 ug de hfB wt			
hfB4	0,0 ug	0,0 ug	0,0 ug	0,0 ug	0,0 ug
% de inhibición	100 ± 0,0	99,3 ± 1,5	100,3 ± 0,0	100,1 ± 0,3	96,1 ± 0,8

**Ejemplo 12. Generación y Caracterización de una Construcción de Expresión de hfB3-Fc y una Proteína hfB3-Fc**

hfB3-Fc es una proteína de fusión entre hfB3 y un Fc de IgG. Específicamente, la longitud completa de la proteína hfB3 se fusionó con un Fc de IgG4 de humano.

Para crear una construcción de expresión de hfB3-Fc, un producto de PCR se amplificó de la construcción de expresión de hfB3 (SEQ ID NO: 5) descrita en el Ejemplo 1 utilizando dos cebadores: el cebador directo 5'-GCGCACCGGTGCTAGCGAATTCGGCGACAAGAAGGGCAGCTGCGA-3' (SEQ ID NO: 19); y el cebador inverso 5'-GCGCAGATCTCAGGAAGCCC AGGTCCTCAT-3' (SEQ ID NO: 20). El producto de PCR de 377 pb que contenía la región de codificación para la terminación C de la hfB3-Fc a continuación se digirió con Age I y Bgl II y se ligó en pFUSE-hlgG4Fc (Invivogen, Código de Cat.: pfuse-hg4fc1) el cual se digirió previamente con Age I y Bgl II, creando el plásmido



phfB3Cterm-Fc. La construcción de expresión de hfb3 (SEQ ID NO: 5, descrita en el Ejemplo 1) se digirió con EcoR I y EcoR V. El fragmento de EcoR I/EcoR V que contenía la terminación N de hfb3 se ligó en phfB3Cterm-Fc el cual se digirió previamente con EcoR I y EcoR V, creando el phfB3-Fc. El plásmido phfB3-Fc se digirió con Nhe I y el fragmento que contenía las secuencias de codificación de hfb3 y Fc se ligó en la construcción de pCI modificada con IRES-Neo descrito en el Ejemplo 1, creando la construcción de expresión de hfb3-Fc (SEQ ID NO: 18). Esta construcción de expresión de hfb3-Fc incluye, de 5' a 3', un promotor de CMV, un intrón quimérico, una secuencia de codificación para hfb3-Fc, un marcador seleccionable de IRES-Neo y una poliA sintética. La construcción completa se secuenció para confirmar la integridad de la construcción (SEQ ID NO: 18). La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la proteína hfb3-Fc.

Una línea de células estable que expresa la proteína hfb3-Fc se generó mediante la transfección mediada por PEI y la selección de fármaco de las células 293 como se describe en el Ejemplo 3. Las células seleccionadas por el fármaco se cultivaron a  $2 \times 10^6$  células/ml durante 72 horas. A continuación la expresión de la proteína hfb3-Fc se examinó al someter 2  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo de células a una SDS-PAGE no reductora y el análisis de inmunotransferencia Western. Como se muestra en la Figura 8, dos bandas de la proteína hfb3-Fc fueron detectadas por el anticuerpo específico anti-factor B de cabra (R&D Systems, No. de Cat. AF2739). Los marcadores de peso molecular en kDa se indican a la izquierda. Sin desear ser limitado por teoría alguna, estas dos bandas de la proteína hfb3-Fc podrían representar monómeros y dímeros de la proteína. La actividad biológica de la proteína hfb3-Fc (en el sobrenadante de cultivo de células) se examinó por medio de un ensayo de actividad hemolítica como se describe en el Ejemplo 7. Como se muestra en la Tabla 3, la proteína hfb3-Fc inhibió la actividad de la vía alternativa del complemento.

**Tabla 3. Inhibición con hfb3-Fc de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humano**

	Control sin wt	Compite con 0,5 $\mu$ g de hfb wt	
Sobrenadante de hfb3-Fc	0	35 $\mu$ l	20 $\mu$ l
% de Inhibición	100 $\pm$ 0,0	100,2 $\pm$ 0,8	92,6 $\pm$ 8,5

**Ejemplo 13. Efecto del Congelamiento/Descongelamiento Repetido sobre la Inhibición del Complemento por la hfb3-292S**

La proteína hfb3-292S se purificó como se describiera en el Ejemplo 9 utilizando el procedimiento de cromatografía de HIC de un paso. La proteína hfb3-292S purificada en PBS, retirada de un congelador a -80°C y descongelada a temperatura ambiente, se contó como el primer ciclo de congelamiento y descongelamiento. Después de este descongelamiento, la concentración de proteína hfb3-292S se ajustó a 2 mg/ml con PBS y una alícuota de hfb3-292S se tomó una muestra y se guardó sobre hielo como la muestra de primer congelamiento y descongelamiento. El tubo de la proteína hfb3-292S entonces se congeló al apoyar el tubo en un baño de metanol/hielo seco durante 20 minutos y a continuación el descongelamiento a temperatura ambiente hasta que se descongeló completamente (el segundo ciclo de congelamiento y descongelamiento). Se tomó una alícuota de la muestra y se apartó antes de repetir el siguiente ciclo de congelamiento y descongelamiento. La actividad biológica de las muestras de cada ciclo de congelamiento y descongelamiento (7 veces en total) se analizó al medir su capacidad para competir con el factor B de humano de tipo salvaje en el ensayo hemolítico mediado por la vía alternativa del complemento como se describe en el Ejemplo 7. Cada reacción contenía una cantidad fija de factor B de humano de tipo salvaje (0,5  $\mu$ g) con cantidades crecientes de hfb3-292S. Los resultados mostrados en la Tabla 4 representan el porcentaje de inhibición en el ensayo hemolítico.

Estos resultados demuestran que la proteína hfb3-292S aún puede inhibir de manera efectiva la hemólisis mediada por la vía alternativa incluso después de siete ciclos de congelamiento y descongelamiento (Tabla 4). Un nivel similar de inhibición de hemólisis se observó a través de todas las muestras que exhibían que el congelamiento y descongelamiento repetido (hasta 7 veces) no afectó la estabilidad de la proteína hfb3-292S para inhibir la hemólisis mediada por el complemento.

**Tabla 4. hfB3-292S Después de los ciclos de Congelamiento/Descongelamiento**

Cantidad de hfB3-292S en Cada Reacción	Ciclos de Congelamiento/Descongelamiento						
	1	2	3	4	5	6	7
1,0 µg	103,6 +/- 0,4	103,9 +/- 1,3	103,3 +/- 0,1	100,6 +/- 0,5	101,3 +/- 1,4	102,5 +/- 1,2	101,2 +/- 0,4
0,5 µg	104,5 +/- 0,6	102,7 +/- 1,0	102,6 +/- 0,5	101,5 +/- 1,5	102,9 +/- 2,1	102,4 +/- 0,9	100,0 +/- 1,8
0,25 µg	98,8 +/- 1,0	99,8 +/- 2,0	99,5 +/- 0,6	97,9 +/- 1,5	97,1 +/- 0,8	97,8 +/- 0,5	95,5 +/- 0,6
0,125 µg	80,7 +/- 2,2	88,3 +/- 1,3	84,2 +/- 1,1	85,6 +/- 0,8	77,6 +/- 3,7	80,0 +/- 1,4	74,8 +/- 2,3

**Ejemplo 14. Mayor Termoestabilidad de la Proteína hfB3-292S que la Proteína hfB3**

Las proteínas hfB3 y hfB3-292S se purificaron como se describe en el Ejemplo 9 utilizando el procedimiento de cromatografía de HIC de un paso. Las proteínas hfB3 y hfB3-292S purificadas, ambas de PBS, se retiraron de -80°C. La concentración de proteína se reajustó a 2 mg/ml en PBS (pH 7,4). Las proteínas hfB3 y hfB3-292S se prorrataron equitativamente en tres tubos eppendorf de 0,6 ml (40 µL por tubo) y a continuación se almacenaron en condiciones de 4°C, -80°C y 37°C durante 7 días. La actividad biológica (capacidad para inhibir la hemólisis mediada por el complemento) de cada una de las muestras almacenadas se analizó al medir su capacidad para inhibir la hemólisis mediada por la vía alternativa del complemento como se describe en el Ejemplo 7. Los resultados de este ensayo hemolítico mostraron que el almacenamiento a 4°C u -80°C durante 7 días no afectó la capacidad de sus hfB3 o hfB3-292S para inhibir la hemólisis mediada por la vía alternativa del complemento. Sin embargo, la proteína hfB3 almacenada a 37°C durante 7 días perdió esencialmente toda su actividad biológica en las cuatro muestras sometidas a prueba. Notablemente, la hfB3-292S almacenada a 37°C durante 7 días conservó bien su actividad biológica y aún pudo competir de manera efectiva con el factor B de humano de tipo salvaje (Tabla 5). Los resultados mostrados en la Tabla 5 representan el porcentaje de inhibición de actividad alternativa del complemento humano (con desviación estándar) por ya sea hfB3 o hfB3-292S. Estos resultados indicaron que la proteína hfB3-292S tiene mayor termoestabilidad que la proteína hfB3 a 37°C.

Tabla 5. Termoestabilidad de hfB3 y hfB3-292S

Muestra	Tratamiento	Cantidad de hfB3 Purificada en Cada Reacción + 0,5 µg de Factor B Humano de Tipo Salvaje			
		1,0 µg	0,5 µg	0,25 µg	0,125 µg
hfB3	4°C durante 7 días	99,6 ± 0,2	99,1 ± 0,9	98,2 ± 0,6	88,7 ± 0,7
	-80°C durante 7 días	99,8 ± 1,2	98,2 ± 1,8	97,2 ± 1,1	89,2 ± 5,8
	37°C durante 7 días	0,0 ± 5,5	0,0 ± 3,7	0,3 ± 5,8	4,1 ± 6,4
		Cantidad de hfB3-292S Purificado en Cada Reacción + 0,5 µg de Factor B Humano de Tipo Salvaje			
		1,0 µg	0,5 µg	0,25 µg	0,125 µg
hfB3- 292S	4°C durante 7 días	98,4 ± 0,6	98,4 ± 0,9	97,8 ± 0,3	83,1 ± 3,0
	-80°C durante 7 días	99,0 ± 0,3	98,4 ± 0,7	96,8 ± 0,8	81,7 ± 2,1
	37°C durante 7 días	98,2 ± 0,4	94,6 ± 0,9	78,2 ± 2,9	48,0 ± 1,3

#### Ejemplo 15. Determinación del Punto de Fusión de Proteínas del factor B Humano, fB3 y fB3-292S

La temperatura de fusión de proteínas (Tf) es una medida de la estabilidad térmica de una proteína y los cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína pueden afectar, entre otras cosas, la estabilidad térmica de la proteína. La proteína del factor B de humano (hfB) contiene veintitrés residuos de cisteína, veintidós de los cuales aparecen como pares de enlaces de disulfuro (cistina) y uno de los cuales, C292, está presente en una forma de sulfhidrilo libre no apareada.

Los perfiles de temperatura de fusión de la proteína hfB3 (K258A, R259A, K260A, D279G, N285D) y la proteína hfB3-292S (el residuo de cisteína no apareado, individual de la proteína hfB3 se modificó a serina) se compararon con aquel de la proteína hfB al incubar cada proteína en presencia del ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico (ANS) y medir el incremento en la fluorescencia de ANS a 460 nm. El ANS se enlaza a regiones hidrófobas de la proteína (Stryer, J. Molecular Biology (1965) 13:482-495) y se ha utilizado para investigar el efecto de la temperatura sobre la hidrofobicidad superficial de la proteína hfB (Takada, *et al.*, Complement (1985) 2:193-203). Las muestras que contenían la proteína hfB (35 µg), la proteína hfB3 (50 µg) y la proteína hfB3-292S (39 µg) se prepararon en 100 µL de tampón de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato 10 mM, pH 7,4) que contenía ANS 10 mM (Invitrogen, # de Catálogo A-47). Las muestras de cada proteína (por triplicado) se incubaron en tubos de polipropileno cerrados durante treinta minutos a 21°C, 30°C, 37°C, 44°C, 47°C, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C. Las muestras se transfirieron a una microplaca clara de 96 pocillos (Costar, # de Catálogo 3635) y la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro de microplaca Perceptive Biosystems Cytofluor 4000 (excitación=60/40 nm, emisión=460/40 nm). Los resultados se analizaron utilizando un ajuste de curvas 4PL no lineal. Los valores de Tf (promedio de los resultados de dos experimentos) para la proteína hfB de tipo salvaje, la proteína hfB3 y la proteína hfB3-292S se determinó que eran 46,4°C, 45,1°C y 47,0°C, respectivamente. Los cinco cambios de aminoácidos hechos en la proteína hfB3 con respecto a la proteína hfB de tipo salvaje (K258A, R259A, K260A, D279G, N285D) dieron por resultado una  $\Delta T_f = -1,3^\circ\text{C}$ , lo que indica que la proteína hfB3 fue menos estable térmicamente en comparación con la proteína hfB de tipo salvaje correspondiente. Sin embargo, la Tf de la proteína

hfB3-292S (47,0°C) dio por resultado una  $\Delta T_f = +1,9^\circ\text{C}$  con respecto a la proteína hfB3 e indicó que la proteína hfB3-292S era por lo menos estable térmicamente como la proteína hfB de tipo salvaje (46,4°C).

5 Por lo tanto, contrario a los resultados de Culajay et al. (Biochemistry (2000) 39:7153-7158) los cuales mostraron que la sustitución de un residuo de cisteína por serina en la proteína del factor de crecimiento de fibroblastos humano (FGF-1) (C83S o C117S) disminuyó la  $T_f$  por 13°C y 2°C, respectivamente, la sustitución de serina de hfB3 en el aminoácido C292 dio por resultado que la hfB3-292S fuera más estable térmicamente que la hfB3.

#### 10 **Ejemplo 16. La Proteína hfB3-292S Previene la Inflamación y el Daño en las Articulaciones en un Modelo de Artritis Reumatoide de Ratón**

15 La artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) es un modelo agresivo de ratón para la artritis reumatoide (Terato K *et al.*, J. Immunol (1992) 148(7):2103-8; Terato K *et al.*, Autoimmunity (1995) 22(3):137-47). En este modelo, un cóctel de anticuerpos de colágeno que contiene 4 anticuerpos monoclonales contra el colágeno (Chondrex, Inc., Número de Catálogo: 10010) con un refuerzo de LPS se utilizó para inducir la artritis en ratones macho de tipo salvaje DBA/1J de seis semanas de edad (Jackson Laboratory).

20 Cuarenta ratones se dividieron en tres grupos. El Grupo 1 tuvo 10 ratones que sirvieron como un grupo de control de vehículo donde 100  $\mu\text{L}$  de PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) se inyectaron en la vena de la cola en el día 0, una inyección de refuerzo de 25  $\mu\text{g}$  de LPS (List Biological Lab, Campbell, California, Número de Catálogo: 421) por ratón se administró por la ruta intraperitoneal (LPS estaba en PBS a una concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en el día 3 y 100  $\mu\text{L}$  de PBS nuevamente por vía de la vena de la cola en los días 3, 5, 7 y 9. El Grupo 2 tuvo 15 ratones que se inyectaron con el cóctel de anticuerpos de colágeno (0,25 mg en 100  $\mu\text{L}$  de PBS por ratón) por vía de la vena de la cola en el día 0, recibieron una inyección de refuerzo de 25  $\mu\text{g}$  de LPS en el día 3 y se les administró 100  $\mu\text{L}$  de PBS por vía de la vena de la cola en los días 3, 5, 7 y 9. El Grupo 3 tuvo 15 ratones que se inyectaron con 0,25 mg del cóctel de anticuerpos de colágeno y 1 mg de la proteína hfB3-292S, ambos juntos en 100  $\mu\text{L}$  de PBS por ratón por vía de la vena de la cola en el día 0, se les administró una inyección de refuerzo de 25  $\mu\text{g}$  de LPS en el día 3 y se les administró 1 mg de la proteína hfB3-292S en 100  $\mu\text{L}$  de PBS por vía de la vena de la cola en los días 3, 5, 7 y 9.

30 Los ratones se examinaron todos los días. El peso de cada ratón se registró cuando tuvo lugar la medición de las articulaciones. Las articulaciones de las patas delanteras y los miembros posteriores se midieron utilizando calibradores para tanto la anchura como el espesor en los días -1, 4, 6, 9 y 11. La secuencia de medición fue el miembro frontal izquierdo, miembro posterior izquierdo, miembro posterior derecho y miembro frontal derecho. En el día 11, todos los animales se sacrificaron y todos los miembros (miembro frontal izquierdo, miembro frontal derecho, miembro posterior izquierdo y miembro posterior derecho) se recolectaron y se almacenaron en casetes de plástico etiquetados individualmente. Cada casete se colocó en una caja de recipiente de histología que contenía 10% de solución de formalina tamponada neutra.

40 Esos miembros de ratón se sometieron al seccionamiento con parafina y la tinción con H&E para examinar la patogénesis en las articulaciones. Específicamente, después de la fijación, cada miembro de cada ratón se transfirió por separado a un casete de plástico. Los miembros se enjuagaron con agua corriente en un matraz durante 30 minutos (min) a temperatura ambiente (RT) para retirar la solución de fijación. A continuación cada casete se transfirió a un matraz que contenía solución descalcificada (Thermo Scientific, Número de Catálogo 8340) mediante la inmersión del casete en la solución. Los miembros frontales se descalcificaron durante 8 horas y los miembros posteriores se descalcificaron durante 9 horas. Después de 8 horas o 9 horas, los miembros se enjuagaron nuevamente con agua corriente durante 30 minutos a temperatura ambiente para retirar la solución descalcificada. Después de la descalcificación, los miembros se almacenaron en etanol al 70% durante toda la noche (O/N) para el siguiente paso de deshidratación. Los miembros se deshidrataron al sumergirlos secuencialmente en: etanol al 75% (hecho a partir de etanol al 100%) durante dos ocasiones; etanol al 85% durante dos ocasiones, etanol al 95% durante dos ocasiones y etanol al 100% durante dos ocasiones, cada ocasión durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después, los miembros se sumergieron en una mezcla 1:1 de etanol al 100% y aceite de madera de cedro (Fisher, Número de Catálogo: 040-1) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación y se repitió dos veces más durante un total de tres veces. Los miembros a continuación se sumergieron en aceite de madera de cedro al 100% y se incubaron a 40°C durante 5 horas. Después de la incubación durante 5 horas, los miembros se sumergieron en una mezcla 1:1 de aceite de madera de cedro y salicilato de metilo (ACROS, Número de Catálogo 119-36-8) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los miembros a continuación se sumergieron en otra mezcla 1:1 de aceite de madera de cedro y salicilato de metilo durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de la incubación durante toda la noche, los miembros se sumergieron en salicilato de metilo al 100% durante 40 minutos a temperatura ambiente, se repitió una vez más (un total de dos veces). Finalmente, los miembros se sumergieron en parafina que se preparó mediante la incubación a 60°C durante 7 horas.

60

Las secciones de parafina de los miembros de ratón se prepararon utilizando un bisturí y se cortaron a un espesor de 7  $\mu\text{m}$ . Las secciones se incubaron en un baño de agua a 40°C y se transfirieron a un portaobjetos de microscopio Superfrost Plus<sup>MR</sup>. Los cortes se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente y se secaron adicionalmente mediante la incubación durante toda la noche en un calentador de cortes. Los cortes se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la tinción.

Las secciones de parafina montadas de los miembros de ratón se sometieron a la tinción con H&E. Las secciones se desparafinaron y se rehidrataron mediante la inmersión en xileno durante 3 minutos repetida 2 veces para un total de 3 veces. El exceso de xileno a continuación se secó con papel secante y las secciones se sumergieron en etanol al 100% durante 3 minutos, para un total de 3 veces, a continuación etanol al 95% durante 3 minutos, una vez, etanol al 80% durante 3 minutos, una vez, y agua desionizada durante 5 minutos, una vez. Todas las incubaciones fueron a temperatura ambiente. Para la tinción con hematoxilina, los portaobjetos se sumergieron en hematoxilina durante 4 minutos, una vez, y se enjuagaron con agua desionizada. Los portaobjetos se sumergieron en agua de la llave durante 5 minutos una vez para permitir que la mancha se desarrollara. Los portaobjetos se sumergieron rápidamente, 8-12 veces, en etanol ácido (200 ml de etanol al 70% más 150  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado) para decolorar las secciones. Los portaobjetos a continuación se enjuagaron dos veces durante 1 minuto en agua de la llave y a continuación una vez durante 2 minutos en agua desionizada. El exceso de agua se secó con papel secante de los portaobjetos antes de la tinción con eosina.

Para la tinción con eosina, los portaobjetos se sumergieron en eosina una vez durante 20 segundos. Los portaobjetos a continuación se deshidrataron mediante la inmersión en etanol al 95% 3 veces durante 5 minutos. Los portaobjetos se incubaron en etanol al 100% 3 veces durante 5 minutos. El exceso de etanol se secó con papel secante y los portaobjetos se incubaron en xileno tres veces durante 15 minutos. Los cubreobjetos se adhirieron a los portaobjetos utilizando Permount basado en xileno (EMS, Número de Catálogo 17986-01) al colocar una gota de Permount sobre el portaobjetos utilizando una varilla de vidrio teniendo cuidado de no formar burbujas. El cubreobjetos a continuación se inclinó sobre el portaobjetos y se dejó caer suavemente sobre el portaobjetos. El Permount se dejó expandir debajo del cubreobjetos para cubrir la sección completa. Los portaobjetos se secaron durante toda la noche a temperatura ambiente en una campana química.

Como se muestra en la Figura 10, el grupo inyectado con el cóctel de anticuerpos de colágeno en ausencia de hfB3-292S (Grupo 2) indujo un grave hinchamiento de las patas frontales. Los ratones inyectados con el cóctel de anticuerpos, pero que se trataron con la proteína hfB3-292S (Grupo 3) mostraron una reducción del 65% en el tamaño de la pata ( $p < 0,0003$ ) (Figura 10). Estos resultados demuestran un efecto inhibitorio significativo de la artritis de las articulaciones en este modelo por parte de la hfB3-292S. A 250  $\mu\text{g}$  de dosificación de cóctel de anticuerpos de colágeno por ratón para la inducción de CAIA, los miembros posteriores de los ratones no mostraron un hinchamiento obvio. No se observó un efecto adverso significativo para el tratamiento con la proteína hfB3-292S sobre el peso del ratón. El peso promedio de todos los ratones se mantuvo de manera estable. El peso promedio para todos los ratones en los tres grupos fue  $20,4 \pm 1,1$  gramos al final del estudio.

Como se muestra en la Figura 9, los ratones en el Grupo 1 parecieron tener articulaciones normales, sin infiltración detectable de células inflamatorias en la articulación y el cartílago y los huesos parecieron normales (Figura 9, panel superior). Los ratones en el Grupo 2 tuvieron una inflamación grave en las articulaciones, infiltración de células inflamatorias, formación de cataratas, daño de cartílago y erosión ósea (Figura 9, panel intermedio). Los ratones en el Grupo 3 tratados con hfB3-292S tuvieron una estructura de articulación normal, sin infiltración de células inflamatorias, sin erosión o daño de cartílago o hueso (Figura 9, panel inferior).

Estos datos demostraron que la hfB3-292S fue significativamente eficaz en la prevención de la inflamación de articulaciones y el daño en este modelo de ratón de CAIA, demostrando la utilidad terapéutica de la proteína hfB3-292S para la artritis reumatoide.

#### **Ejemplo 17. Generación y Caracterización de una Construcción de Expresión de hfB3-292S-Fc y una Proteína hfB3-292S-Fc**

Una línea de células estable que expresa la proteína hfB3-292S-Fc (SEQ ID NO: 22) se generó mediante la transfección mediada por PEI y la selección de fármacos de células 293 como se describiera en el Ejemplo 3. Las células seleccionadas con fármacos se cultivaron a  $2 \times 10^6$  células/ml durante 72 horas. A continuación la expresión de proteína hfB3-292S-Fc se examinó al someter 2  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cultivo de células a una SDS-PAGE no reductora y el análisis de inmunotransferencia Western. Dos bandas de proteína hfB3-292S-Fc se detectaron mediante un anticuerpo específico anti-factor B de cabra. (Los datos no se muestran). Sin desear ser limitado por teoría alguna, estas dos

bandas de proteína hfB3-292S-Fc podrían representar monómeros y dímeros de la proteína.

La hfB3-292S-Fc se purificó con una columna de Proteína A. La actividad biológica de la proteína hfB3-292S-Fc purificada se examinó mediante un ensayo de actividad hemolítica como se describiera en el Ejemplo 7. Como se muestra en la Tabla 6, la proteína hfB3-292S-Fc inhibió la actividad de la vía alternativa del complemento de una manera dependiente de la dosis.

**Tabla 6. Inhibición con hfB3-292S-Fc de la actividad hemolítica de la vía alternativa del complemento humano**

	Control sin hfB wt	Compite con 0,5 µg de hfB wt			
Cantidad de hfB3-292S-Fc (µg)	0	2,0	1,0	0,5	0,3
% de inhibición	100 +/- 0,0	93,8 +/- 1,9	75,4 +/- 1,2	47,3 +/- 3,2	34,0 +/- 5,3

#### **Ejemplo 18. hfB3-292S Truncada en la Terminación C**

Se hizo una construcción de expresión de genes que expresó una forma truncada de la hfB3-292S en donde los 284 aminoácidos C-terminales (el dominio de serina proteasa) se suprimieron. La molécula se diseñó como hfB3-292SN480 la cual está constituida de 480 aminoácidos N-terminales de la hfB3-292S (aminoácidos 1-480 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2 después de la escisión del péptido de secreción). La secuencia de ADN de la construcción de expresión para la hfB3-292SN480 se muestra en la SEQ ID NO: 24 en donde los nucleótidos 1064-2509 son la secuencia de codificación para la hfB3-292SN480. La construcción de expresión se transfirió en células 293 FreeStyle y se seleccionó con G418 como se describiera previamente en el Ejemplo 3. El medio de cultivo de células clonales resistentes a G418 se sujetó a un análisis de inmunotransferencia Western para la expresión de hfB3-292SN480 utilizando la hfB3-292S de longitud completa como un control (carril izquierdo). Como se muestra en la Figura 11, el análisis de inmunotransferencia Western con un anticuerpo monoclonal específicamente para la hfB3-292S detectó una banda de aproximadamente 55 KDa del medio de cultivo de células del carril de células de hfB3-292SN480 (carril derecho), lo que sugiere que incluso con una supresión de 280 aminoácidos de la terminación C de la hfB3-292S, los 480 aminoácidos N-terminales se pueden expresar a un tamaño apropiado.

Un ensayo alternativo de la actividad del complemento se realizó como se describiera previamente, para determinar si la hfB3-292SN480 puede inhibir la actividad del complemento alternativa. Como se muestra en la Figura 13, el sobrenadante de cultivo de células, de células que expresan la hfB3-292SN480, inhibió la actividad de complemento alternativa de una manera dependiente de la dosis. Esto demuestra que los fragmentos de hfB3-292S aún pueden retener la capacidad para inhibir la actividad del complemento y por lo tanto se pueden utilizar como se describiera en este documento para la hfB3-292S (SEQ ID NO: 2).

#### **Ejemplo 19. Proteína de Fusión de hfB3-292S/Fc Monomérica hfB3-292S/Fc-mono**

Se diseñó una construcción de expresión de genes que codificaba una hfB3-292S de longitud completa "fusionada" a un Fc de IgG4 de humano. La hfB3-292S es un monómero cuando se produce en células de mamífero, tal como células de humano como se describiera previamente, por ejemplo, véase la Figura 3 descrita en el Ejemplo 6 la cual muestra que la hfB3-292S se detectó como una banda a aproximadamente 100 KDa PM bajo condiciones no reductoras, lo que sugiere que la hfB3-292S es un monómero. Dos cisteínas en la región de rótula del Fc de IgG4 de humano se mutaron para asegurar que la proteína de fusión sería un monómero y retendría la propiedad biológica de la hfB3-292S para inhibir la actividad del complemento. Dos cisteínas se mutaron al sustituirlas cada una por serina. Esta proteína de fusión de hfB3-292S y el Fc de IgG4 mutado se designó hfB3-292S/Fc-mono. La secuencia de ADN para esta construcción de expresión de proteína de fusión se muestra en la SEQ ID NO: 26. La secuencia de aminoácidos correspondiente para la hfB3-292S/Fc-mono se muestra en la SEQ ID NO: 25 en donde los aminoácidos 1-764 son la región de hfB3-292S y los

aminoácidos 765-1003 son la región de Fc de IgG4 de humano en donde los aminoácidos 782 y 785 son aminoácidos de serina que se sustituyeron por residuos de cisteína encontrados en un Fc de IgG4 de humano nativo.

5 La construcción de expresión de genes hfB3-292S/Fc-mono (SEQ ID NO: 26) se transfectó en células 293 FreeStyle de humano. Las células a continuación se sometieron a la selección con G418. El medio de cultivo de las células resistentes al fármaco se sujetó al análisis de inmunotransferencia Western para la proteína de fusión. Como se muestra en la Figura 12, una banda a aproximadamente 115 KDa se detectó mediante el anticuerpo anti-factor B humano de cabra purificado en esta SDS-PAGE no reductora y análisis de inmunotransferencia Western. Las dos bandas más altas fueron muy probablemente agregados de la proteína de fusión monomérica. Los datos sugirieron que la proteína de fusión monomérica entre la hfB3-292S y el Fc de IgG4 de humano (hfB3-292S/Fc-mono) se expresó exitosamente en células de mamífero y que la mayoría de la proteína de fusión pareció ser monomérica.

15 Para examinar si la hfB3-292S/Fc-mono conservó la propiedad de bloqueo de la actividad del complemento alternativa de la hfB3-292S, un ensayo de actividad del complemento alternativa se realizó como se describiera previamente. Como se muestra en la Figura 14, el sobrenadante de cultivo de células de células que producían la hfB3-292S/Fc-mono inhibió la actividad del complemento alternativa de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que la actividad inhibitoria del complemento de la hfB3-292S no se perdió en esta proteína de fusión de hfB3-292S/Fc-mono monomérica.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> wellstat ImmunoTherapeutics, LLC  
 <120> ANÁLOGOS DEL FACTOR B DE COMPLEMENTO Y SUS USOS  
 25 <130> 21002-PCT  
 <150> US 61/482,827  
 <151> 2011-05-05  
 30 <150> US 61/497,835  
 <151> 2011-06-16  
 <150> US 61/568,518  
 35 <151> 2011-12-08  
 <160> 27  
 <170> PatentIn version 3.5  
 40 <210> 1  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 1  
 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 55 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 60 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 65 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80

ES 2 738 628 T3

Ser Trp Ser Thr Leu<sub>85</sub> Lys Thr Gln Asp Gln<sub>90</sub> Lys Thr Val Arg Lys<sub>95</sub> Ala  
 5 Glu Cys Arg Ala<sub>100</sub> Ile His Cys Pro Arg<sub>105</sub> Pro His Asp Phe Glu<sub>110</sub> Asn Gly  
 10 Glu Tyr Trp<sub>115</sub> Pro Arg Ser Pro Tyr<sub>120</sub> Tyr Asn Val Ser Asp<sub>125</sub> Glu Ile Ser  
 15 Phe His<sub>130</sub> Cys Tyr Asp Gly Tyr<sub>135</sub> Thr Leu Arg Gly Ser<sub>140</sub> Ala Asn Arg Thr  
 20 Cys Gln Val Asn Gly Arg<sub>150</sub> Trp Ser Gly Gln Thr<sub>155</sub> Ala Ile Cys Asp Asn<sub>160</sub>  
 25 Gly Ala Gly Tyr Cys<sub>165</sub> Ser Asn Pro Gly Ile<sub>170</sub> Pro Ile Gly Thr Arg<sub>175</sub> Lys  
 30 Val Gly Ser Gln<sub>180</sub> Tyr Arg Leu Glu Asp<sub>185</sub> Ser Val Thr Tyr His<sub>190</sub> Cys Ser  
 35 Arg Gly Leu<sub>195</sub> Thr Leu Arg Gly Ser<sub>200</sub> Gln Arg Arg Thr Cys<sub>205</sub> Gln Glu Gly  
 40 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu<sub>215</sub> Pro Ser Cys Gln Asp<sub>220</sub> Ser Phe Met Tyr  
 45 Asp Thr Pro Gln Glu Val<sub>230</sub> Ala Glu Ala Phe Leu<sub>235</sub> Ser Ser Leu Thr Glu<sub>240</sub>  
 50 Thr Ile Glu Gly Val<sub>245</sub> Asp Ala Glu Asp Gly<sub>250</sub> His Gly Pro Gly Glu<sub>255</sub> Gln  
 55 Gln Lys Arg Lys<sub>260</sub> Ile Val Leu Asp Pro<sub>265</sub> Ser Gly Ser Met Asn<sub>270</sub> Ile Tyr  
 60 Leu Val Leu<sub>275</sub> Asp Gly Ser Asp Ser<sub>280</sub> Ile Gly Ala Ser Asn<sub>285</sub> Phe Thr Gly  
 65 Ala Lys<sub>290</sub> Lys Cys Leu Val Asn<sub>295</sub> Leu Ile Glu Lys Val<sub>300</sub> Ala Ser Tyr Gly  
 70 Val Lys Pro Arg Tyr Gly<sub>310</sub> Leu Val Thr Tyr Ala<sub>315</sub> Thr Tyr Pro Lys Ile<sub>320</sub>  
 Trp Val Lys Val Ser<sub>325</sub> Glu Ala Asp Ser Ser<sub>330</sub> Asn Ala Asp Trp Val<sub>335</sub> Thr  
 Lys Gln Leu Asn<sub>340</sub> Glu Ile Asn Tyr Glu<sub>345</sub> Asp His Lys Leu Lys<sub>350</sub> Ser Gly  
 Thr Asn Thr<sub>355</sub> Lys Lys Ala Leu Gln<sub>360</sub> Ala Val Tyr Ser Met<sub>365</sub> Met Ser Trp



ES 2 738 628 T3

5 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 10 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 15 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 20 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 25 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 30 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 35 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 40 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 45 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 50 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 55 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 60 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 65 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 70 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
 580 585 590  
 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
 595 600 605  
 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
 610 615 620  
 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
 625 630 635 640  
 70

ES 2 738 628 T3

Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
 645 650 655  
 5 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
 660 665 670  
 10 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
 675 680 685  
 15 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
 690 695  
 20 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
 705 710 715 720  
 25 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
 725 730 735  
 30 His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
 740 745 750  
 35 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu  
 755 760  
 <210> 2  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Análogo de la proteína de factor B de complemento  
 40 <400> 2  
 45 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15  
 50 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 55 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 60 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 65 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80  
 70 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
 85 90 95  
 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
 100 105 110

ES 2 738 628 T3

Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125  
 5 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
 130 135 140  
 10 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 15 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
 165 170 175  
 20 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 25 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 30 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 35 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 40 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 45 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 50 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 55 Ala Lys Lys Ser Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 60 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 65 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 70 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400

ES 2 738 628 T3

5 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
405 410 415

Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
420 425 430

10 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
435 440 445

15 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
450 455 460

20 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
465 470 475 480

25 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
485 490 495

Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
500 505 510

30 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
515 520 525

35 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
530 535 540

40 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
545 550 555 560

Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
565 570 575

45 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
580 585 590

50 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
595 600 605

55 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
610 615 620

60 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
625 630 635 640

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

65 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
660 665 670

70

ES 2 738 628 T3

Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
675 680 685

5 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
690 695 700

10 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
705 710 715 720

15 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
725 730 735

20 His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
740 745 750

25 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu  
755 760

30 <210> 3  
<211> 764  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
1 5 10 15

40 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
20 25 30

45 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
35 40 45

50 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
50 55 60

55 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
65 70 75 80

60 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
85 90 95

65 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
100 105 110

70 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
115 120 125

75 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
130 135 140

ES 2 738 628 T3

Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 5 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
 165 170 175  
 10 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 15 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 20 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 25 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 30 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 35 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 40 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 45 Ala Lys Lys Ser Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 50 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 55 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 60 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 65 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 70 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 65 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 70 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430

ES 2 738 628 T3

5 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 10 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 15 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 20 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 25 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 30 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 35 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 40 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 45 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 50 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
 580 585 590  
 55 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
 595 600 605  
 60 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
 610 615 620  
 65 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
 625 630 635 640  
 70 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
 645 650 655  
 75 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
 660 665 670  
 80 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
 675 680 685  
 85 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
 690 695 700  
 90

ES 2 738 628 T3

Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
 705 710 715 720  
 5 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
 725 730 735  
 10 His Ala Arg Asn Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
 740 745 750  
 15 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu  
 755 760  
 <210> 4  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Análogo de la proteína del factor B de complemento  
 25 <400> 4  
 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15  
 30 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 35 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 40 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 45 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80  
 50 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
 85 90 95  
 55 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
 100 105 110  
 60 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125  
 65 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
 130 135 140  
 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 70 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
 165 170 175



ES 2 738 628 T3

Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 5 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 10 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 15 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 20 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 25 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 30 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 35 Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 40 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 45 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 50 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 55 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 60 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 65 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 70 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 75 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 80 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 85 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460

ES 2 738 628 T3

5 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 10 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 15 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 20 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 25 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 30 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
 580 585 590  
 35 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
 595 600 605  
 40 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
 610 615 620  
 45 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
 625 630 635 640  
 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
 645 650 655  
 50 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
 660 665 670  
 55 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
 675 680 685  
 60 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
 690 695 700  
 65 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
 705 710 715 720  
 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
 725 730 735  
 70

ES 2 738 628 T3

His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
 740 745 750

5 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu  
 755 760

10 <210> 5  
 <211> 7754  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción de la expresión de hfb3

<400> 5  
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
 20 ttggccattg catagcttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
 25 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240  
 gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360  
 30 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420  
 cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480  
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac 540  
 35 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacc 660  
 40 cgccccgttg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720  
 tcgttttagtg aaccgtcaga tactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaata 780  
 tgctaacgca gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgtgct 840  
 45 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaagggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900  
 actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960  
 50 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020  
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgggtacc 1080  
 tctagagtcg actagctcct gccccaggcc cagcttctct cctgccttcc aacgccatgg 1140  
 55 gctccaacct gtccccccag ctgtgcctga tgcctttcat cctgggcctg ctgtctggcg 1200  
 gcgtgaccac cacccttgg tccctggcca ggcctcaggg ctctgtctcc ctggaggcg 1260  
 60 tggagatcaa gggcggctcc ttccggctgc tgcaggaagg ccaggctctg gagtacgtgt 1320  
 gcccttccgg cttctaccct taccctgtgc agacaaggac ctgtaggtcc accggctctt 1380  
 65 ggtccacact gaaaaccag gaccagaaaa ccgtccggaa ggccgagtgc cgggcatcc 1440  
 actgcctcgc gcctcacgac ttcgagaacg gcgagtactg gcctcggctc cttactaca 1500  
 acgtgtccga cgagatctcc ttccactgct acgacggcta caccctgcgg ggctccgcca 1560  
 70 acaggacctg ccagggtcaac ggccgggtgg cggccagac cgccatctgc gacaacggcg 1620

ES 2 738 628 T3

ctggctactg ctccaaccct ggcatacccta tcggcacccg gaaggtcggc tcccagtacc 1680  
 5 ggctggagga ctccgtgacc taccactgct ccagaggcct gaccctgaga ggctcccagc 1740  
 ggcgcacctg tcaggaaggt ggcagctggt ctggcaccga accatcttgc caggactcct 1800  
 tcatgtacga caccctcag gaagtggcgg aggccttcct gtcctccctg accgagacaa 1860  
 10 tcgagggcgt ggacgccgag gatggccacg gccctggcga gcagcaggcc gctgccatcg 1920  
 tgctggaccc ctccggctcc atgaacatct acctggtgct ggacggctcc ggcagcatcg 1980  
 gcgcctccga cttcaccggc gccaaagaagt gcctggtcaa cctgatcgag aagggtggcct 2040  
 15 cctacggcgt gaagcctaga tacggcctgg tgacctacgc cacctaccct aagatctggg 2100  
 tgaaggtgtc cgaggccgac tcctccaacg ccgactgggt gaccaagcag ctgaacgaga 2160  
 20 tcaactacga ggaccacaag ctgaagtccg gcaccaacac caagaaggcc ctgcaggccg 2220  
 tctactccat gatgtcctgg cctgacgacg tgcctcctga gggctggaac cggacccggc 2280  
 acgtgattat cctgatgacc gacggcctgc acaacatggg cggcgaccct atcacctgta 2340  
 25 tcgacgagat ccgggacctg ctgtacatcg gcaaggaccg gaagaaccct cgggaggact 2400  
 acctggacgt gtacgtgttc ggcgtgggcc ctctggtgaa ccagggtcaac atcaacgccc 2460  
 30 tggcctccaa gaaggacaac gagcagcacg tgttcaaggt caaggacatg gagaacctgg 2520  
 aggacgtgtt ctaccagatg atcgatgagt cccagtcctt gagcctgtgc ggcattgtct 2580  
 gggagcaccg caagggaaac gactaccaca agcagccttg gcaggccaag atctccgtga 2640  
 35 tccggccttc caagggccac gagtcctgca tggcgccgt ggtgtccgag tacttcgtgc 2700  
 tgaccgccgc tcaactgttc accgtggacg acaaggaaca ctccatcaa gtctccgtgg 2760  
 40 gcggcgagaa gcgggacctg gagatcgagg tgggtgtggt ccaccctaac tacaacatca 2820  
 acggcaagaa ggaagccggc atccctgagt tctacgacta cgacgtggcc ctgatcaagc 2880  
 tgaagaataa gctgaagtat ggccagacca tccggcctat ctgcctgcct tgcaccgagg 2940  
 45 gcaccaccag ggccctgcgg ctgcctccta ccaccacctg ccagcagcag aaggaagagc 3000  
 tgctgcctgc ccaggacatc aaggccctgt tcgtgtccga ggaagagaag aagctgacct 3060  
 50 ggaaggaagt gtacatcaag aacggcgaca agaagggcag ctgcgagcgg gacgcccagt 3120  
 acgcccctgg ctacgataag gtcaaggata tctccgaggt ggtgaccctt cggttcctgt 3180  
 gcaccggcgg agtgtcccc tacgccgacc ctaacacctg cagaggcgac tctggcggcc 3240  
 55 ctctgatcgt gcacaagcgg tcccgttca tccaggtcgg cgtgatctcc tggggcgtgg 3300  
 tggacgtgtg caagaaccag aagcggcaga agcaggtccc cgcccacgcc cgggacttcc 3360  
 60 acatcaacct gttccagtg ctgccttggc tgaaggaaaa gctgcaggat gaggacctgg 3420  
 gcttcctgtg aggggttcc tgctggacag ggcgtggga ttgacgcccc tctccctccc 3480  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaaataag ccggtgtgctg tttgtctata 3540  
 65 tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 3600  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggctgtg 3660  
 70 tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3720

ES 2 738 628 T3

cgaccctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3780  
 5 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaaccca gtgccacgtt gtgagttgga 3840  
 tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3900  
 cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat 3960  
 10 gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc 4020  
 tttgaaaaac acgatgataa gcttgccaca acccgggata attcctgcag ccaatatggg 4080  
 atcggccatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 4140  
 15 attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct 4200  
 gtcagcgtag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg ccctgaatga 4260  
 20 actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 4320  
 tgtgtctgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 4380  
 gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 4440  
 25 aatggggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcca ttcgaccacc aagcgaaaca 4500  
 tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 4560  
 30 cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgcgcatgcc 4620  
 cgacggcgat gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 4680  
 35 aatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 4740  
 ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 4800  
 cttcctcgtg ctttacgta tcgccgctcc cgattcgag cgcatcgctt tctatcgctt 4860  
 40 tcttgacgag ttcttctgag ctagtcgacc cgggcggcct cgagaataaa caatcattat 4920  
 tttcattgga tctgtgtgtt ggtttttgt gtggccttg gggaggggga ggccagaatg 4980  
 actccaagag ctacaggaag gcaggtcaga gacccactg gacaaacagt ggctggactc 5040  
 45 tgcaccataa cacacaatca acaggggagt gagctggatc gagctgctcg agatccgggc 5100  
 tggcgtaata gcgaagaggc ccgaccgat cgcccttccc aacagttgcy cagcctgaat 5160  
 50 ggcgaatgga cgcgccctgt agcggcgcag taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca 5220  
 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgccgctcc tttcgctttc ttcccttctt 5280  
 55 ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt 5340  
 tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc caaaaaact tgattagggt gatggttcac 5400  
 gtagtgggcc atcgccctga tagacggtt ttcgccctt gacgttgag tccacgttct 5460  
 60 ttaatagtgg actcttgttc caaactgga caaactcaa ccctatctcg gtctattctt 5520  
 ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac 5580  
 65 aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgcttac aatttcctga tgcggtattt 5640  
 tctccttacg catctgtgcy gattttcaca ccgcatatgg tgcaactca gtacaatctg 5700  
 ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgccca acaccgctg acgcgccctg 5760  
 70 acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 5820

ES 2 738 628 T3

catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 5880  
 acgcctatth ttataggtta atgtcatgat aataatggth tcttagacgt caggtggcac 5940  
 5 ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatth ttctaaatac attcaaatac 6000  
 gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 6060  
 10 tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattccctth tttgcggcat tttgccttcc 6120  
 tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 6180  
 acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 6240  
 15 cgaagaacgt tttccaatga tgagcactth taaagttctg ctatgtggcg cggattatc 6300  
 ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt 6360  
 20 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 6420  
 atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttactt cagacaacgat 6480  
 cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttht gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 6540  
 25 tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 6600  
 gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc 6660  
 30 ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg 6720  
 ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc 6780  
 tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tgtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 6840  
 35 cagcagggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc 6900  
 ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 6960  
 40 tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataactctcat 7020  
 gaccaaactt ccttaacgtg agttttcgth cactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 7080  
 caaaggatct tcttgagatc tttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 7140  
 45 accaccgcta ccagcgggtg tttgthtgc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 7200  
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgth cttctagtgt agccgtagth 7260  
 50 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgth 7320  
 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggthtgact caagacgata 7380  
 gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggth tcgtgcacac agcccagctt 7440  
 55 ggagcgaac acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac 7500  
 gcttcccga gggagaaaag cggacaggta tccggtaagc ggaggggtcg gaacaggaga 7560  
 60 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggthtctg 7620  
 ccacctctga cttgagcgtc gaththtgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 7680  
 65 aaacgccagc aacgcggcct ttttacggth cctggcctth tgctggcctt ttgctcacat 7740  
 ggctcgacag atct 7754

70 <210> 6  
 <211> 34

ES 2 738 628 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 caccggcgcc aagaagagcc tggcaacct gatc 34  
  
 10 <210> 7  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador  
  
 20 <400> 7  
 gatcaggttg accaggctct tcttggcgcc ggtg 34  
  
  
 25 <210> 8  
 <211> 7754  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Construcción de expresión  
  
 <400> 8  
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
 ttggccattg catagcttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
 35 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240  
 40 gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
 agtaacgcc aatagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360  
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420  
 45 cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480  
 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacac 540  
 50 caatgggctg gcatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaagtgc gtaataacc 660  
 55 cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720  
 tcgttttagtg aaccgtcaga tactagaag ctttattgcg gtatgtttatc acagttaaat 780  
 tgctaacgca gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgtgct 840  
 60 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gttaaggag accaatagaa 900  
 actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960  
 65 tgacatccac tttgccttcc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020  
 aggctagagt acttaatagc actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtggtacc 1080  
 tctagagtcg actagctcct gccccaggcc cagcttctct cctgccttcc aacgccatgg 1140  
 70 gctccaacct gtccccccag ctgtgcctga tgcctttcat cctgggcctg ctgtctggcg 1200

ES 2 738 628 T3

	gcgtgaccac cacccttgg tccctggcca ggcctcaggg ctctgctcc ctggagggcg	1260
5	tggagatcaa gggcggctcc ttccggctgc tgcaggaagg ccaggctctg gagtacgtgt	1320
	gcccttccgg cttctaccct taccctgtgc agacaaggac ctgtaggtcc accggctctt	1380
	ggccacact gaaaaccag gaccagaaaa ccgtccggaa ggccgagtgc cgggccatcc	1440
10	actgccctcg gcctcacgac ttcgagaacg gcgagtactg gcctcggctcc cttactaca	1500
	acgtgtccga cgagatctcc ttccactgct acgacggcta caccctgcgg ggctccgcca	1560
15	acaggacctg ccaggtaaac ggccggtggt ccggccagac cgccatctgc gacaacggcg	1620
	ctggctactg ctccaaccct ggcataccta tcggcacccg gaaggtcggc tcccagtacc	1680
	ggctggagga ctccgtgacc taccactgct ccagaggcct gaccctgaga ggctcccagc	1740
20	ggcgcacctg tcaggaaggt ggcagctggt ctggcaccga accatcttgc caggactcct	1800
	tcattgtacga caccctcag gaagtggccg aggccttctc gtcctccctg accgagacaa	1860
25	tcgagggcgt ggacgccgag gatggccacg gccctggcga gcagcaggcc gctgccatcg	1920
	tgtctggacc ctccggctcc atgaacatct acctggtgct ggacggctcc ggcagcatcg	1980
	gcgcctccga cttaccggc gccaaaga gcctggtcaa cctgatcgag aaggtggcct	2040
30	cctacggcgt gaagcctaga tacggcctgg tgacctacgc cacctaccct aagatctggg	2100
	tgaaggtgtc cgaggccgac tcctcaacg ccgactgggt gaccaagcag ctgaacgaga	2160
35	tcaactacga ggaccacaag ctgaagtccg gcaccaacac caagaaggcc ctgcaggccg	2220
	tctactccat gatgtcctgg cctgacgacg tgcctcctga gggctggaac cggaccggc	2280
	acgtgattat cctgatgacc gacggcctgc acaacatggg cggcgaccct atcaccgtga	2340
40	tcgacgagat ccgggacctg ctgtacatcg gcaaggaccg gaagaaccct cgggaggact	2400
	acctggacct gtactgtttc ggcgtgggccc ctctggtgaa ccaggtaaac atcaacgccc	2460
45	tggcctccaa gaaggacaac gagcagcacg tgttcaaggt caaggacatg gagaacctgg	2520
	aggacgtggt ctaccagatg atcgatgagt cccagtcctt gagcctgtgc ggcattgtct	2580
	gggagcaccg caagggaaacc gactaccaca agcagccttg gcaggccaag atctccgtga	2640
50	tccggccttc caagggccac gagtcctgca tgggcgccgt ggtgtccgag tacttctgtc	2700
	tgaccgccgc tcaactgttc accgtggacg acaaggaaca ctccatcaaa gtctccgtgg	2760
55	gcggcgagaa gcgggacctg gagatcgagg tgggtctggt ccaccctaac tacaacatca	2820
	acggcaagaa ggaagccggc atccctgagt tctacgacta cgacgtggcc ctgatcaagc	2880
	tgaagaataa gctgaagtat ggccagacca tccggcctat ctgcctgcct tgcaccgagg	2940
60	gcaccaccag ggccctgcgg ctgcctccta ccaccacctg ccagcagcag aaggaagagc	3000
	tgctgcctgc ccaggacatc aaggccctgt tcgtgtccga ggaagagaag aagctgacct	3060
65	ggaaggaagt gtacatcaag aacggcgaca agaagggcag ctgcgagcgg gacgcccagt	3120
	acgcccctgg ctacgataag gtcaaggata tctccgaggt ggtgacctt cggttcctgt	3180
	gcaccggcgg agtgtcccc tacgccgacc ctaacacctg cagagggcag tctggcggcc	3240
70	ctctgatcgt gcacaagcgg tcccgttca tccaggtcgg cgtgatctcc tggggcgtgg	3300



ES 2 738 628 T3

tggacgtgtg caagaaccag aagcggcaga agcagggtccc cgcccacgcc cgggacttcc 3360  
 5 acatcaacct gttccaggtg ctgccttggc tgaaggaaaa gctgcaggat gaggacctgg 3420  
 gcttcctgtg aggggtttcc tgctggacag gggcgtggga ttgacgcccc tctccctccc 3480  
 cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tgaataagg ccggtgtgcg tttgtctata 3540  
 10 tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 3600  
 tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 3660  
 15 tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 3720  
 cgacccttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 3780  
 cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaaccca gtgccacggt gtgagttgga 3840  
 20 tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 3900  
 cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacat 3960  
 25 gtgtttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc 4020  
 tttgaaaaac acgatgataa gcttgccaca acccgggata attcctgcag ccaatatggg 4080  
 atcggccatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 4140  
 30 attcggctat gactgggcac aacagacaat cggtgctct gatgccgccg tgttccggct 4200  
 gtcagcgtag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 4260  
 35 actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcggtc cttgcgtagc 4320  
 tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 4380  
 gcaggatctc ctgtcatctc accttgcctc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 4440  
 40 aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca 4500  
 tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtcct gtcgatcagg atgatctgga 4560  
 45 cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc 4620  
 cgacggcgat gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 4680  
 aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 4740  
 50 ggacatagcg ttggctacct gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 4800  
 cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct 4860  
 55 tcttgacgag ttcttctgag ctagtgcacc cgggcggcct cgagaataaa caatcattat 4920  
 tttcattgga tctgtgtggt ggttttttgt gtgggcttgg gggaggggga ggccagaatg 4980  
 actccaagag ctacaggaag gcaggtcaga gacccactg gacaaacagt ggctggactc 5040  
 60 tgcaccataa cacacaatca acaggggagt gagctggatc gagctgctcg agatccgggc 5100  
 tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgag cagcctgaat 5160  
 65 ggcgaatgga cgcgccctgt agcggcgcag taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca 5220  
 gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcccgctcc tttcgctttc ttccttccct 5280  
 ttctcggcac gttcggcggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc ctttagggg 5340  
 70 tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggg gatggttcac 5400

ES 2 738 628 T3

gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct 5460  
 5 ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caaactcaa ccctatctcg gtctattctt 5520  
 ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac 5580  
 aaaaatttaa cgcaattttt aacaaaatat taacgcttac aatttcctga tgcggtattt 5640  
 10 tctccttacg catctgtgcy gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg 5700  
 ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg 5760  
 15 acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 5820  
 catgtgtcag aggttttcac cgctcatcacc gaaacgcgcy agacgaaagg gcctcgtgat 5880  
 acgcctatth ttataggtta atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt cagggtggcac 5940  
 20 ttttcgggga aatgtgcygcy gaaccctat ttgtttatth ttctaaatac attcaaatac 6000  
 gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 6060  
 25 tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattccctth tttgcggcat tttgccttcc 6120  
 tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 6180  
 acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 6240  
 30 cgaagaacgt tttccaatga tgagcactth taaagttctg ctatgtggcy cggattatc 6300  
 ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt 6360  
 35 ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 6420  
 atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcygcy aacttactt cagacaacgat 6480  
 cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 6540  
 40 tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 6600  
 gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcygaactac ttactctagc 6660  
 45 ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcy 6720  
 ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc 6780  
 tcgcygtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcy tagttatcta 6840  
 50 cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agatagggtc 6900  
 ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac ttttagattga 6960  
 55 tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataatctcat 7020  
 gaccaaactc cttaacgtg agttttcgtt cactgagcy tcagaccccg tagaaaagat 7080  
 caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcytaatc tgctgcttgc aaacaaaaa 7140  
 60 accaccgcta ccagcgttgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 7200  
 ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagt 7260  
 65 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt 7320  
 accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttgact caagacgata 7380  
 gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt 7440  
 70 ggagcgaacy acctacaccg aactgagata cctacagcyt gagctatgag aaagcggccac 7500

ES 2 738 628 T3

gcttcccgaaggaggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 7560  
 5 gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 7620  
 ccacctctga cttgagcgtc gatttttgatg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa 7680  
 aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 7740  
 10 ggctcgacag atct 7754

<210> 9  
 <211> 23  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 20 Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu  
 1 5 10 15

Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 25 20

<210> 10  
 <211> 23  
 30 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10  
 35 Ile Gly Ser Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Arg Cys Leu Thr Asn Leu  
 1 5 10 15

Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 40 20

<210> 11  
 <211> 23  
 45 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 11  
 50 Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Arg Cys Leu Ala Asn Leu  
 1 5 10 15

Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 55 20

<210> 12  
 <211> 23  
 60 <212> PRT  
 <213> Sus scrofa

<400> 12  
 65 Ile Gly Ala Arg Asn Phe Thr Gly Ala Lys Asn Cys Leu Lys Asp Phe  
 1 5 10 15

Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 70 20

ES 2 738 628 T3

5 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Macaca mulatta  
 <400> 13

10 Ile Gly Ala Gly Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu  
 1 5 10 15

15 Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 20

20 <210> 14  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries  
 <400> 14

25 Val Gly Ala His Asn Phe Thr Gly Ala Lys Asn Cys Leu Arg Asp Phe  
 1 5 10 15

30 Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr  
 20

35 <210> 15  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 15  
 gtccccgcc acgcccggaa cttccacatc aacctgttcc 40

45 <210> 16  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 16  
 ggaacaggtt gatgtggaag ttccgggct ggcggggac 40

55 <210> 17  
 <211> 764  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Análogo de la proteína del factor B de complemento

65 <400> 17  
 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15

70

ES 2 738 628 T3

Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 5 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 10 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 15 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80  
 20 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
 85 90 95  
 25 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
 100 105 110  
 30 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125  
 35 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
 130 135 140  
 40 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 45 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
 165 170 175  
 50 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 55 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 60 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 65 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 70 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300

ES 2 738 628 T3

5 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 10 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 15 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 20 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 25 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 30 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 35 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 40 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 45 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 50 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 55 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 60 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 65 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 70

ES 2 738 628 T3

Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
580 585 590

5 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
595 600 605

10 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
610 615 620

15 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
625 630 635 640

20 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
645 650 655

25 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
660 665 670

30 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
675 680 685

35 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
690 695 700 705

40 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
710 715 720

45 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
725 730 735

50 His Ala Arg Asn Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
740 745 750

55 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu  
755 760

50 <210> 18  
<211> 8465  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> construcción de expresión

60 <400> 18  
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

60 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

65 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

70 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420

ES 2 738 628 T3

cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480  
 5 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540  
 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacct 660  
 10 cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720  
 tcgttttagt aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaata 780  
 15 tgctaacgca gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgggtc 840  
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gttaaggag accaatagaa 900  
 actgggcttg tcgagacaga gaagactcct gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960  
 20 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020  
 aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcga ttcacgcgtg gtacctctag 1080  
 25 agtcgactag ctctgcccc aggcccagct tctctcctgc cttccaacgc catgggctcc 1140  
 aacctgtccc cccagctgtg cctgatgcct ttcacctggt gcctgctgtc tggcggcgtg 1200  
 accaccacc cttggtcctt ggccaggcct cagggtcct gctccctgga gggcgtggag 1260  
 30 atcaagggcg gtccttccg gctgctgcag gaagggcagg ctctggagta cgtgtgccct 1320  
 tccggcttct acccttacc tgtgcagaca aggacctgta ggccaccgg ctcttggctc 1380  
 35 aactgaaaa cccaggacca gaaaaccgtc cggaaggccg agtgccgggc catccactgc 1440  
 cctcggcctc acgacttca gaacggcgag tactggcctc ggtcccctta ctacaacgtg 1500  
 tccgacgaga tctccttcca ctgctacgac ggctacacc tcgcgggctc cgccaacagg 1560  
 40 acctgccagg tcaacggccg gtggtccggc cagaccgcca tctgcgacaa cggcgctggc 1620  
 tactgctcca accctggcat ccctatcggc acccggagg tcggctcca gtaccggctg 1680  
 45 gaggactccg tgacctacca ctgctccaga ggcctgacct tgagaggctc ccagcggcgc 1740  
 acctgtcagg aagggtggcag ctggtctggc accgaacct cttgccagga ctcttctatg 1800  
 tacgacacc ctcaggaagt ggccgaggcc tctctgtcct ccctgaccga gacaatcgag 1860  
 50 ggcgtggacg ccgaggatgg ccacggcct ggcgagcagc aggccgctgc catcgtgctg 1920  
 gaccctccg gctccatgaa catctacctg gtgctggacg gctccggcag catcggcgcc 1980  
 55 tccgacttca ccggcgcaa gaagtgcctg gtcaacctga tcgagaagg ggcctcctac 2040  
 ggcgtgaagc ctagatacgg cctggtgacc tacgccacct accctaagat ctgggtgaag 2100  
 gtgtccgagg ccgactcctc caacgccgac tgggtgacca agcagctgaa cgagatcaac 2160  
 60 tacgaggacc acaagctgaa gtccggcacc aacaccaaga aggccctgca ggccgtctac 2220  
 tccatgatgt cctggcctga cgacgtgcct cctgagggct ggaaccggac ccggcacgtg 2280  
 65 attatcctga tgaccgacgg cctgcacaac atggcgggcg accctatcac cgtgatcgac 2340  
 gagatccggg acctgctgta catcggaag gaccggaaga accctcggga ggactacctg 2400  
 gacgtgtacg tgttcggcgt gggccctctg gtgaaccagg tcaacatcaa cgccctggcc 2460  
 70 tccaagaagg acaacgagca gcacgtgttc aaggtaagg acatggagaa cctggaggac 2520



ES 2 738 628 T3

gtgttctacc agatgatcga tgagtcccag tcctgagcc tgtgcggcat ggtctgggag 2580  
 5 caccgcaagg gaaccgacta ccacaagcag ccttggcagg ccaagatctc cgtgatccgg 2640  
 ccttccaagg gccacgagtc ctgcatgggc gccgtggtgt ccgagtactt cgtgctgacc 2700  
 gccgctcact gcttcaccgt ggacgacaag gaacactcca tcaaagtctc cgtgggcggc 2760  
 10 gagaagcggg acctggagat cgaggtggtg ctgttccacc ctaactaaa catcaacggc 2820  
 aagaaggaag ccggcatccc tgagttctac gactacgacg tggccctgat caagctgaag 2880  
 15 aataagctga agtatggcca gaccatccgg cctatctgcc tgccctgcac cgagggcacc 2940  
 accagggccc tgcggctgcc tcctaccacc acctgccagc agcagaagga agagctgctg 3000  
 cctgcccagg acatcaaggc cctgttcgtg tccgaggaag agaagaagct gacccggaag 3060  
 20 gaagtgtaca tcaagaacgg cgacaagaag ggagctgagc agcgggacgc ccagtacgcc 3120  
 cctggctacg ataaggtcaa ggatatctcc gagtggtgga cccctcgggt cctgtgcacc 3180  
 25 ggcggagtggt cccctacgc cgaccctaac acctgcagag gcgactctgg cggccctctg 3240  
 atcgtgcaca agcgggtccc gttcatccag gtcggcgtga tctcctgggg cgtggtggac 3300  
 gtgtgcaaga accagaagcg gcagaagcag gtccccgccc acgcccggga cttccacatc 3360  
 30 aacctgttcc aggtgctgcc ttggctgaag gaaaagctgc aggatgagga cctgggcttc 3420  
 ctgagatctc ccccatgccc atcatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 3480  
 35 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 3540  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 3600  
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 3660  
 40 cgtgtggtca gcgtcctcac cgctctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 3720  
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 3780  
 45 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 3840  
 aaccaggctca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 3900  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 3960  
 50 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 4020  
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 4080  
 55 ctctccctgt ctccgggtaa atgagtgcta gcctcgagaa ttcacgcgtg gtacctctag 4140  
 agtcgatcta gggcggccaa ttccgcccct ctccctccc cccccctaac gttactggcc 4200  
 gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt ttgtctatat gttatthtcc accatattgc 4260  
 60 cgtcttttgg caatgtgagg gcccggaaac ctggccctgt cttcttgacg agcattccta 4320  
 ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc aaggctctgt gaatgtcgtg aaggaagcag 4380  
 65 ttctcttgga agcttcttga agacaaacaa cgctctgtagc gaccctttgc aggcagcggg 4440  
 accccccacc tggcgacagg tgcctctgag gccaaaagcc acgtgtataa gatacacctg 4500  
 caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg tgagttggat agttgtggaa agagtcaaat 4560  
 70 ggctctcctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta cccattgta 4620

ES 2 738 628 T3

tgggatctga tctggggcct cgggtgcacat gctttacatg tgtttagtcg aggttaaaaa 4680  
 5 aacgtctagg cccccgaac cacggggagc tggttttcct ttgaaaaaca cgatgataag 4740  
 cttgccacaa cccgggataa ttcctgcagc caatatggga tcggccattg aacaagatgg 4800  
 attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 4860  
 10 acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgg 4920  
 tctttttgtc aagaccgacc tgtccggctg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 4980  
 15 gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgvcagct gtgctcgacg ttgtcactga 5040  
 agcgggaagg gactggctgc tattgggca agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 5100  
 ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtc 5160  
 20 tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaacat cgcacgcagc gagcacgtac 5220  
 tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 5280  
 25 gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgatg atctcgtcgt 5340  
 gaccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 5400  
 catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccg 5460  
 30 tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat 5520  
 cgccgctccc gattcgcagc gcatgcctt ctatgcctt cttgacgagt tcttctgagg 5580  
 35 ggatcaattc tctagtcgac ccgggcggcc tcgagaataa acaatcatta ttttcattgg 5640  
 atctgtgtgt tggttttttg tgtgggcttg ggggaggggg aggccagaat gactccaaga 5700  
 gctacaggaa ggcaggctag agacccact ggacaaacag tggctggact ctgcaccata 5760  
 40 acacacaatc aacaggggag tgagctggat cgagctgctc gagatccggg ctggcgtaat 5820  
 agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 5880  
 45 acgvcgacctg tagcggcgca ttaagcggc cgggtgtggt ggttacgvc agcgtgaccg 5940  
 ctacacttgc cagcggccta gcgcccgtc ctttcgctt cttcccttcc tttctcgcca 6000  
 cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 6060  
 50 gtgctttacg gcacctgac ccaaaaaaac ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc 6120  
 catcggcctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttggg gtccacgtt tttaatagtg 6180  
 55 gactcttggt ccaaactgga acaactca accctatctc ggtctattct tttgatttat 6240  
 aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 6300  
 acgcaattt taacaaaata ttaacgctta caatttcctg atgcggtatt ttctccttac 6360  
 60 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgactctc agtacaatct gctctgatgc 6420  
 cgcatagtta agccagcccc gacaccgccc aacaccgct gacvcgacct gacgggcttg 6480  
 65 tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca 6540  
 gaggttttca ccgtcatcac cgaaacvcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacvcctatt 6600  
 tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg 6660  
 70 aaatgtvcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaata cattcaata tgtatccgt 6720

ES 2 738 628 T3

catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataattattga aaaaggaaga gtatgagtat 6780  
 tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 6840  
 5 tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 6900  
 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 6960  
 10 ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 7020  
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat aactattct cagaatgact tggttgagta 7080  
 ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 7140  
 15 tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 7200  
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 7260  
 20 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc 7320  
 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca 7380  
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 7440  
 25 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggtat 7500  
 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 7560  
 30 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggtg cctcactgat 7620  
 taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 7680  
 tcatttttaa tttaaaagga tctagtgtaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 7740  
 35 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 7800  
 ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct 7860  
 40 accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 7920  
 cttcagcaga gcgagatac caaatactgt tcttctagtg tagccgtagt taggccacca 7980  
 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 8040  
 45 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 8100  
 taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 8160  
 50 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 8220  
 agggagaaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 8280  
 ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 8340  
 55 acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag 8400  
 caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctgcct tttgctcaca tggctcgaca 8460  
 60 gatct 8465

<210> 19  
 <211> 45  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador  
 70

ES 2 738 628 T3

<400> 19  
gcgaccggg gctagcgaat tcggcgacaa gaagggcagc tgcga 45

5 <210> 20  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador

<400> 20  
gcgcagatct caggaagccc aggtcctcat 30

15 <210> 21  
<211> 990  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Análogo de la proteína del factor B de complemento con dominio Fc

25 <400> 21  
Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
1 5 10 15

30 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
20 25 30

35 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
35 40 45

40 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
50 55 60

45 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
65 70 75 80

50 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
85 90 95

55 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
100 105 110

60 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
115 120 125

65 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
130 135 140

70 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
145 150 155 160

Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
165 170 175

ES 2 738 628 T3

Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 5 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 10 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 15 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 20 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 25 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 30 Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 35 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 40 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 45 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 50 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 55 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 60 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 65 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 70 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460

ES 2 738 628 T3

5 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
465 470 475 480

10 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
485 490 495

15 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
500 505 510

20 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
515 520 525

25 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
530 535 540

30 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
545 550 555 560

35 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
565 570 575

40 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
580 585 590

45 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
595 600 605

50 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
610 615 620

55 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
625 630 635 640

60 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
645 650 655

65 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
660 665 670

70 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
675 680 685

75 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
690 695 700

80 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
705 710 715 720

85 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
725 730 735

90

ES 2 738 628 T3

His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
 740 745 750  
 5 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu Arg Ser Pro Pro  
 755 760 765  
 10 Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 770 775 780  
 15 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 785 790 795 800  
 20 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 805 810 815  
 25 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 820 825 830  
 30 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 835 840 845  
 35 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 850 855 860  
 40 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 865 870 875 880  
 45 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 885 890 895  
 50 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 900 905 910  
 55 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 915 920 925  
 60 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 930 935 940  
 65 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 945 950 955 960  
 70 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 965 970 975  
 75 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 980 985 990  
 80 <210> 22  
 <211> 990  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 85 <220>

ES 2 738 628 T3

<223> Análogo de la proteína del factor B de complemento

<400> 22

5 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
1 5 10 15

10 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
20 25 30

15 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
35 40 45

20 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
50 55 60

25 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
65 70 75 80

30 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
85 90 95

35 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
100 105 110

40 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
115 120 125

45 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
130 135 140

50 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
145 150 155 160

55 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
165 170 175

60 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
180 185 190

65 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
195 200 205

70 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
210 215 220

75 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
225 230 235 240

80 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
245 250 255

85 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
260 265 270



ES 2 738 628 T3

5 Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 10 Ala Lys Lys Ser Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 15 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 20 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 25 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 30 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 35 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 40 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 45 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 50 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 55 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 60 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 65 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 70 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540

ES 2 738 628 T3

Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 5 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 10 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
 580 585 590  
 15 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
 595 600 605  
 20 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
 610 615 620  
 25 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
 625 630 635 640  
 30 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
 645 650 655  
 35 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
 660 665 670  
 40 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
 675 680 685  
 45 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
 690 695 700  
 50 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
 705 710 715 720  
 55 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
 725 730 735  
 60 His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
 740 745 750  
 65 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu Arg Ser Pro Pro  
 755 760 765  
 70 Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 770 775 780  
 75 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 785 790 795 800  
 80 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 805 810 815  
 85 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 820 825 830

ES 2 738 628 T3

5 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 835 840 845  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 850 855 860  
 10 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 865 870 875 880  
 15 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 885 890 895  
 20 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 900 905 910  
 25 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 915 920 925  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 930 935 940  
 30 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 945 950 955 960  
 35 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 965 970 975  
 40 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 980 985 990  
 45 <210> 23  
 <211> 990  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Análogo de la proteína del factor B de complemento  
 50 <400> 23  
 55 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 60 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 65 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 70 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80

ES 2 738 628 T3

5 Ser Trp Ser Thr Leu<sub>85</sub> Lys Thr Gln Asp Gln<sub>90</sub> Lys Thr Val Arg Lys<sub>95</sub> Ala  
 Glu Cys Arg Ala<sub>100</sub> Ile His Cys Pro Arg<sub>105</sub> Pro His Asp Phe Glu<sub>110</sub> Asn Gly  
 10 Glu Tyr Trp<sub>115</sub> Pro Arg Ser Pro Tyr<sub>120</sub> Tyr Asn Val Ser Asp<sub>125</sub> Glu Ile Ser  
 15 Phe His<sub>130</sub> Cys Tyr Asp Gly Tyr<sub>135</sub> Thr Leu Arg Gly Ser<sub>140</sub> Ala Asn Arg Thr  
 20 Cys Gln Val Asn Gly Arg<sub>150</sub> Trp Ser Gly Gln Thr<sub>155</sub> Ala Ile Cys Asp Asn<sub>160</sub>  
 25 Gly Ala Gly Tyr Cys<sub>165</sub> Ser Asn Pro Gly Ile<sub>170</sub> Pro Ile Gly Thr Arg<sub>175</sub> Lys  
 Val Gly Ser Gln<sub>180</sub> Tyr Arg Leu Glu Asp<sub>185</sub> Ser Val Thr Tyr His<sub>190</sub> Cys Ser  
 30 Arg Gly Leu<sub>195</sub> Thr Leu Arg Gly Ser<sub>200</sub> Gln Arg Arg Thr Cys<sub>205</sub> Gln Glu Gly  
 35 Gly Ser<sub>210</sub> Trp Ser Gly Thr Glu<sub>215</sub> Pro Ser Cys Gln Asp<sub>220</sub> Ser Phe Met Tyr  
 40 Asp Thr<sub>225</sub> Pro Gln Glu Val<sub>230</sub> Ala Glu Ala Phe Leu<sub>235</sub> Ser Ser Leu Thr Glu<sub>240</sub>  
 45 Thr Ile Glu Gly Val<sub>245</sub> Asp Ala Glu Asp Gly<sub>250</sub> His Gly Pro Gly Glu<sub>255</sub> Gln  
 Gln Ala Ala<sub>260</sub> Ile Val Leu Asp Pro<sub>265</sub> Ser Gly Ser Met Asn<sub>270</sub> Ile Tyr  
 50 Leu Val Leu<sub>275</sub> Asp Gly Ser Gly Ser<sub>280</sub> Ile Gly Ala Ser Asp<sub>285</sub> Phe Thr Gly  
 55 Ala Lys<sub>290</sub> Lys Ser Leu Val Asn<sub>295</sub> Leu Ile Glu Lys Val<sub>300</sub> Ala Ser Tyr Gly  
 60 Val<sub>305</sub> Lys Pro Arg Tyr Gly<sub>310</sub> Leu Val Thr Tyr Ala<sub>315</sub> Thr Tyr Pro Lys Ile<sub>320</sub>  
 65 Trp Val Lys Val Ser<sub>325</sub> Glu Ala Asp Ser Ser<sub>330</sub> Asn Ala Asp Trp Val<sub>335</sub> Thr  
 Lys Gln Leu Asn<sub>340</sub> Glu Ile Asn Tyr Glu<sub>345</sub> Asp His Lys Leu Lys<sub>350</sub> Ser Gly  
 70

ES 2 738 628 T3

Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 5 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 10 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 15 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 20 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 25 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 30 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 35 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 40 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 45 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 50 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 55 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 60 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560  
 65 Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp  
 565 570 575  
 70 Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile  
 580 585 590  
 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg  
 595 600 605  
 Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro  
 610 615 620  
 Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu  
 625 630 635 640

ES 2 738 628 T3

5 Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys  
645 650 655

10 Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile  
660 665 670

15 Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro  
675 680 685

20 Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile  
690 695 700

25 Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly  
705 710 715 720

30 Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala  
725 730 735

35 His Ala Arg Asn Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu  
740 745 750

40 Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu Arg Ser Pro Pro  
755 760 765

45 Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
770 775 780

50 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
785 790 795 800

55 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
805 810 815

60 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
820 825 830

65 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
835 840 845

70 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
850 855 860

75 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
865 870 875 880

80 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
885 890 895

85 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
900 905 910

ES 2 738 628 T3

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 915 920 925

5 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 930 935 940

10 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 945 950 955 960

15 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 965 970 975

20 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 980 985 990

<210> 24  
 <211> 6860  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> construcción de expresión

30 <400> 24  
 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
 ttggccattg catagcttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
 35 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240  
 gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
 40 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360  
 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420  
 cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480  
 45 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac 540  
 caatgggctg gtagtagcgt ttgactcag gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 50 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataacc 660  
 cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtg gaggtctata taagcagagc 720  
 tcgttttagtg aaccgtcaga tactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaa 780  
 55 tgctaacgca gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840  
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gttaaggag accaatagaa 900  
 60 actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960  
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020  
 aggctagagt acttaatcag actcactata ggtagcgcc accatgggct ccaacctgtc 1080  
 65 cccccagctg tgcctgatgc ctttcatcct ggcctgctg tctggcggcg tgaccaccac 1140  
 cccttggctc ctggccaggc ctgaggctc ctgctccctg gagggcgtgg agatcaaggg 1200  
 70 cggctccttc cggctgctgc aggaaggcca ggctctggag tacgtgtgcc cttccggctt 1260

ES 2 738 628 T3

	ctacccttac	cctgtgcaga	caaggacctg	taggtccacc	ggctcttggg	ccacactgaa	1320
5	aaccaggac	cagaaaaccg	tccggaaggc	cgagtgccgg	gccatccact	gccctcggcc	1380
	tcacgacttc	gagaacggcg	agtactggcc	tcggtcccct	tactacaacg	tgtccgacga	1440
	gatctccttc	cactgctacg	acggctacac	cctgcggggc	tccgccaaca	ggacctgcca	1500
10	ggccaacggc	cggtgggtccg	gccagaccgc	catctgcgac	aacggcgctg	gctactgctc	1560
	caaccctggc	atccctatcg	gcacccggaa	ggtcggctcc	cagtaccggc	tggaggactc	1620
15	cgtagacctac	cactgctcca	gaggcctgac	cctgagaggc	tcccagcggc	gcacctgtca	1680
	ggaaggtggc	agctgggtctg	gcaccgaacc	atcttgccag	gactccttca	tgtacgacac	1740
	ccctcaggaa	gtggccgagg	ccttcctgtc	ctccctgacc	gagacaatcg	agggcgtgga	1800
20	cgccgaggat	ggccacggcc	ctggcgagca	gcaggccgct	gccatcgtgc	tggaccctc	1860
	cggtctccatg	aacatctacc	tggtgctgga	cggtctccggc	agcatcggcg	cctccgactt	1920
25	caccggcgcc	agaagagcc	tggtcaacct	gatcgagaag	gtggcctcct	acggcgtgaa	1980
	gcctagatac	ggcctgggtga	cctacgccac	ctaccctaag	atctgggtga	aggtgtccga	2040
	ggccgactcc	tccaacgccg	actgggtgac	caagcagctg	aacgagatca	actacgagga	2100
30	ccacaagctg	aagtccggca	ccaacaccaa	gaaggccctg	caggccgtct	actccatgat	2160
	gtcctggcct	gacgacgtgc	ctcctgaggg	ctggaaccgg	accggcacg	tgattatcct	2220
35	gatgaccgac	ggcctgcaca	acatgggctg	cgaccctatc	accgtgatcg	acgagatccg	2280
	ggacctgctg	tacatcggca	aggaccggaa	gaaccctcgg	gaggactacc	tggacgtgta	2340
	cggtttcggc	gtgggcccctc	tggtgaacca	ggtaacatc	aacgccctgg	cctccaagaa	2400
40	ggacaacgag	cagcacgtgt	tcaaggtcaa	ggacatggag	aacctggagg	acgtgttcta	2460
	ccagatgatc	gatgagtccc	agtccttgag	cctgtgcggc	atgtgataag	ctagcctcga	2520
45	gaattcacgc	gtggtacctc	tagagtcgac	cctctagggc	ggccaattcc	gcccctctcc	2580
	ctccccccc	cctaacgtta	ctggccgaag	ccgcttgaa	taaggccggt	gtgctttgt	2640
	ctatatgtta	ttttccacca	tattgccgtc	ttttggcaat	gtgagggccc	ggaaacctgg	2700
50	ccctgtcttc	ttgacgagca	ttcctagggg	tctttcccct	ctcgccaaag	gaatgcaagg	2760
	tctgttgaat	gtcgtgaagg	aagcagttcc	tctggaagct	tcttgaagac	aaacaacgtc	2820
55	tgtagcgacc	ctttgcaggc	agcggaaacc	cccacctggc	gacaggtgcc	tctgcggcca	2880
	aaagccacgt	gtataagata	cacctgcaaa	ggcggcacia	cccagtgcc	acgttgtgag	2940
	ttggatagtt	gtgaaagag	tcaaatggct	ctcctcaagc	gtattcaaca	aggggctgaa	3000
60	ggatgcccag	aaggtacccc	attgtatggg	atctgatctg	gggcctcggg	gcacatgctt	3060
	tacatgtgtt	tagtcgaggt	taaaaaacg	tctagggccc	ccgaaccacg	gggacgtggt	3120
65	tttcctttga	aaaacacgat	gataagcttg	ccacaaccgg	ggataattcc	tgagccaat	3180
	atgggatcgg	ccattgaaca	agatggattg	cacgcagggt	ctccggccgc	ttgggtggag	3240
	aggctattcg	gctatgactg	ggcacaacag	acaatcggct	gctctgatgc	cgccgtgttc	3300
70	cggtgtctag	cgcaggggcg	cccggttctt	tttgtcaaga	ccgacctgtc	cggtgccctg	3360



ES 2 738 628 T3

5 aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc 3420  
 gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 3480  
 ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gtccttgccg agaaagtatc catcatggct 3540  
 gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg 3600  
 10 aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat 3660  
 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc 3720  
 atgcccgacg gcgatgatct cgctctgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg 3780  
 15 gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 3840  
 tatcaggaca tagcgttggc taccctgatg attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 3900  
 20 gaccgcttcc tcgtgcttta cggatcgcgc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat 3960  
 cgccttcttg acgagttctt ctgaggggat caattctggg cggcctcgag aataaacaat 4020  
 25 cattatthtc attggatctg tgtgttggtt ttttgtgtgg gcttggggga gggggaggcc 4080  
 agaatgactc caagagctac aggaaggcag gtcagagacc cactggaca aacagtggct 4140  
 ggactctgca ccataacaca caatcaacag gggagtgagc tggatcgagc tgctcgagat 4200  
 30 ccgggctggc gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc 4260  
 ctgaatggcg aatggacgcg ccctgtagcg gcgattaag cgcggcgggt gtggtggtta 4320  
 35 cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcctttc gctttcttcc 4380  
 cttcctttct cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 4440  
 tagggttccg atttagtgtt ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggatgatg 4500  
 40 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca 4560  
 cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcgtctt 4620  
 45 attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 4680  
 tttacaacaaa atttaacgcg aattttaaca aatattaac gcttacaatt tcctgatgcg 4740  
 gtatthttct cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac 4800  
 50 aatctgtctt gatgccgat agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc 4860  
 gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 4920  
 55 gagctgcatg tgtcagaggt tttcacgcgc atcaccgaaa cgcgcgagac gaaagggcct 4980  
 cgtgatacgc ctatthttat aggttaatgt catgataata atggthttct agacgtcagg 5040  
 tggcacttht cggggaaatg tgcgcggaac ccctatthgt ttatthttct aaatacattc 5100  
 60 aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataatg cttcaataat attgaaaaag 5160  
 gaagagtatg agtattcaac atthccgtgt cgcccttatt ccctthtttg cggcattthg 5220  
 65 ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 5280  
 ggggtgcacga gtgggttaca tcgaaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 5340  
 tcgccccgaa gaacgthttc caatgatgag cactthttaa gttctgctat gtggcgcggt 5400  
 70 attatcccgt attgacgcgg ggcaagagca actcggctcg cgatacact attctcagaa 5460

ES 2 738 628 T3

tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 5520  
 5 agaattatgc agtgctgccca taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac 5580  
 aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac 5640  
 tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 5700  
 10 cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaacata ttaactggcg aactacttac 5760  
 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 5820  
 15 tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg 5880  
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 5940  
 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 6000  
 20 aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 6060  
 gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa 6120  
 25 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga 6180  
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct gcttgcaaac 6240  
 aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac caactctttt 6300  
 30 tccgaaggta actggcttca gcagagcga gataccaaat actgttcttc tagttagacc 6360  
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 6420  
 35 cctgttacca gtggctgctg ccagtgccga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag 6480  
 acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 6540  
 cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag 6600  
 40 cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac 6660  
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 6720  
 45 gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 6780  
 atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctct gccttttgct ggctttttgc 6840  
 tcacatggct cgacagatct 6860  
 50  
 <210> 25  
 <211> 8435  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> construcción de expresión  
 <400> 25  
 60 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
 65 aatattgacc ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240  
 gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataattgacgt atgttcccat 300  
 70 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ES 2 738 628 T3

	ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
5	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgCGGTTTT ggcagtacac	540
	caatgggCGT ggatagCGgt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
10	caatgggagT ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaagtgc gtaataacc	660
	cGccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tGtAcggtgg gaggtctata taagcagagc	720
	tCGtttagtg aaccgtcaga tCactagaag ctttattgCG gtagtttAtc acagttaaAt	780
15	tGctaacGca gTcagTgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggTc	840
	gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggT tacaagacag gtTtaaggag accaatagaa	900
20	actgggcttg tCgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggTcttac	960
	tGacatccac tttgcctttc tctccacagg tGtccactcc cagttcaatt acagctctta	1020
	aggctagagT acttaatacG actcactata ggctagctcc TGccccaggc ccagcttctc	1080
25	tctgccttc caacgccatg ggctccaacc tGtccccca gctgtgCctg atgcctttca	1140
	tCctgggCct gctgtctggc ggcgtgacca cCacccttg gtccctggcc aggcctcagg	1200
30	gTcctgctc cctggaggGc gtggagatca agggcggtc cttccggctg ctgcaggaag	1260
	gCcaggctct ggagTAcgtg tGcccttcGc gcttctacc ttaccctgtg cagacaagga	1320
	cctgtaggtc caccggctct tggTccacac tGaaaacca ggaccagaaa accgtccgga	1380
35	aggccgagTg cGgggccatc cactgCctc ggctcacga cttcgagaac ggcgagTact	1440
	ggcctcggTc cccttactac aacgtgtccg acgagatctc cttccactgc tacgacggct	1500
40	acaccctgCg gggctccgcc aacaggacct gccaggTcaa cGgCCggtgg tccggccaga	1560
	ccgccatctg cGacaacggc gctggctact gctccaacc tggcatccct atcggcacc	1620
	ggaaggTcGg ctcccagTAc cggctggagg actccgtgac ctaccactgc tccagaggcc	1680
45	tGaccctgag aggtctccag cggcgacct gTcaggaagg tggcagctgg tctggcaccg	1740
	aaccatcttg ccaggactcc ttcatgtacg acaccctca ggaagtggcc gaggccttcc	1800
50	tGtctccct gaccgagaca atcgagggcg tggacgCca ggatggccac ggcctggcg	1860
	agcagcaggc cGctgccatc gtgctggacc cctccggctc catgaacatc tacctggTgc	1920
	tggacggctc cggcagcatc ggcgctccg acttcaccgg cGccaagaag agcctggTca	1980
55	acctgatcga gaaggtggcc tCctacggcg tGaaGcctag atacggcctg gtgacctacg	2040
	ccacctacc taagatctgg gtgaaggTgt ccgaggccga ctctccaac gccgactggg	2100
60	tGaccaagca gTgTaaGag atcaactacg aggaccacaa gTgTaaGtcc ggcaccaaca	2160
	ccaagaaggc cctgcaggcc gtctactcca tGatgtctg gcctgacgac gtgcctctg	2220
	agggctggaa ccggaccCGc cacgtgatta tCctgatgac cGacggcctg cacaacatgg	2280
65	gcggcgacc taccaccgtg atcgacgaga tccgggacct gctgtacatc ggcaaggacc	2340
	ggaagaacc tcgggaggac tacctggacg tGtAcgtgtt cGgCGTggc cctctggTga	2400
70	accaggTcaa catcaacgcc ctggcctcca agaaggacaa cGagcagcac gtgttcaagg	2460

ES 2 738 628 T3

tcaaggacat ggagaacctg gaggacgtgt tctaccagat gatcgatgag tcccagtccc 2520  
 5 tgagcctgtg cggcatggtc tgggagcacc gcaagggAAC cgactaccac aagcagcctt 2580  
 ggcaggccaa gatctccgtg atccggcctt ccaagggcca cgagtcctgc atgggCGCCG 2640  
 tggTgtccga gtacttctgt ctgaccgCCG ctactgtctt caccgtggac gacaaggaac 2700  
 10 actccatcaa agtctccgtg ggcggcgaga agcgggacct ggagatcgag gtggTgtctgt 2760  
 tccaccctaa ctacaacatc aacggcaaga aggaagccgg catccctgag ttctacgact 2820  
 15 acgacgtggc cctgatcaag ctgaagaata agctgaagta tggccagacc atccggccta 2880  
 tctgcctgCC ttgcaccgag ggcaccacca gggccctgCG gctgcctcct accaccacct 2940  
 gccagcagca gaaggaagag ctgctgcctg cccaggacat caaggccctg ttcgtgtccg 3000  
 20 aggaagagaa gaagctgacc cggaaggaag tgtacatcaa gaacggcgac aagaaggga 3060  
 gctgcgagCG ggacgcccag tacgccctg gctacgataa ggtcaaggat atctccgag 3120  
 25 tggTgacccc tcggttctg tgcaccggcg gagtgtcccc ctacgCCgac cctaacacct 3180  
 gcagagggca ctctggcggc cctctgatcg tgcacaagcg gtcccggttc atccaggtcg 3240  
 gcgtgatctc ctggggcgtg gtggacgtgt gcaagaacca gaagcggcag aagcaggtcc 3300  
 30 ccgcccacgc ccgggacttc cacatcaacc tgttccaggt gctgccttgg ctgaaggaaa 3360  
 agctgcagga tgaggacctg ggcttctga gatccaacac caaggtggac aagagagttg 3420  
 35 agtccaaata tggTccccca tccccatcat cccagcacc tgagttcctg gggggacctat 3480  
 cagtcttctt gttccccca aaaccaagg aacttctcat gatctcccgg acccctgagg 3540  
 tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg 3600  
 40 tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgCG ggaggagcag ttcaacagca 3660  
 cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt 3720  
 45 acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag 3780  
 ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga 3840  
 ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg 3900  
 50 tggagTggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgcct cccgtgctgg 3960  
 actccgacgg ctcttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg 4020  
 55 aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga 4080  
 agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgag tctagacagg ggcgtgggat tgacgcccct 4140  
 ctccctcccc cccccctaac gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cggTgtgcgt 4200  
 60 ttgtctatat gttatTTtcc accatattgc cgtcttttgg caatgtgagg gcccgaaac 4260  
 ctggccctgt cttcttgacg agcattccta ggggtctttc ccctctcgcc aaaggaatgc 4320  
 65 aaggtctgtt gaatgtcgtg aaggaagcag ttcctctgga agcttcttga agacaaaca 4380  
 cgtctgtagc gacccttTgc aggcagcggga accccccacc tggcgacagg tgcctctgCG 4440  
 gccaaaagcc acgtgtataa gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg 4500  
 70 tgagttggat agttgtggaa agagtcaaat ggctctcctc aagcgtattc aacaaggggc 4560

ES 2 738 628 T3

tgaaggatgc ccagaaggta cccattgta tgggatctga tctggggcct cgggtgcacat 4620  
 5 gctttacatg tgtttagtcg aggttaaaaa aacgtctagg cccccgaac cacggggacg 4680  
 tggttttcct ttgaaaaaca cgatgataag cttgccacaa cccgggataa ttcctgcagc 4740  
 caatatggga tcggccattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt 4800  
 10 ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt 4860  
 gttccggctg tcagcgcagg ggcgccgggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc 4920  
 15 cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc 4980  
 ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga 5040  
 agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca cttgtctcct gccgagaaag tatccatcat 5100  
 20 ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca 5160  
 agcgaaacat cgcacgcagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga 5220  
 25 tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc 5280  
 gcgcatgccc gacggcgatg atctcgtcgt gaccatggc gatgcctgct tgccgaatat 5340  
 catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcggg 5400  
 30 ccgctatcag gacatagcgt tggctaccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg 5460  
 ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt 5520  
 35 ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagg ggatcaattc tctagtcgac ccgggcggcc 5580  
 tcgagaataa acaatcatta ttttcattgg atctgtgtgt tggttttttg tgtgggcttg 5640  
 ggggaggggg aggccagaat gactccaaga gctacaggaa ggcaggtcag agacccact 5700  
 40 ggacaaacag tggctggact ctgcaccata acacacaatc aacaggggag tgagctggat 5760  
 cgagctgctc gagatccggg ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 5820  
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcgg 5880  
 45 cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgccta gcgccgctc 5940  
 ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccg ctttccccgt caagctctaa 6000  
 50 atcgggggct cccttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac 6060  
 ttgattaggg tgatggttca cgtagtggc catcgcctg atagacggtt tttcgcctt 6120  
 55 tgacgttga gtccacgtt tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaactca 6180  
 accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt 6240  
 taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta 6300  
 60 caatttcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg 6360  
 gtgcaactct agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacaccgcc 6420  
 aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc 6480  
 65 tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc 6540  
 gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga taataatggt 6600  
 70 ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aatgtgctgc ggaacccta tttgtttatt 6660

ES 2 738 628 T3

tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 6720  
 5 ataataattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 6780  
 ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga 6840  
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 6900  
 10 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct 6960  
 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 7020  
 15 aactatttct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 7080  
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgvcggc 7140  
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcaacaacat 7200  
 20 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaa 7260  
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttvcgca aactattaac 7320  
 25 tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa 7380  
 agttvcagga ccacttctgc gtcvcggcct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc 7440  
 tggagccggt gagcgtgggt ctcvcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc 7500  
 30 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 7560  
 acagatvcgt gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta 7620  
 35 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 7680  
 gatccttttt gataatctca tgacaaaat ccctaacgt gagttttcgt tccactgagc 7740  
 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgvcgcta 7800  
 40 ctgctvcctg caaacaacaa aaccaccgct accagvcgtg gtttgvttgc cvgatcaaga 7860  
 gctaccaact cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcvcagatac caaatactgt 7920  
 45 tcttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cvcctacata 7980  
 cctvcctctg ctaatcctgt taccagtggc tvcctvcaggt gvcgataagt cvgttcttac 8040  
 cvggttggac tcaagacgat agttaccgga taagvcgcvag cvgtcgggct gaacgggggg 8100  
 50 ttcgtvcaca cagcccagct tggagvcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcv 8160  
 tgagctatga gaaagvcgca cvcttcccga agggagaaag gvcgacaggt atccggtaa 8220  
 55 cvgcagggtc ggaacaggag agvcacagag gvagcttcca ggggaaacg cctgvttatct 8280  
 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttvcagcvgt cvatttttvt gatvcctvc 8340  
 agggggvcg agcctatgga aaaacvcag caacvcgvc tttttacgvt tcctgvccct 8400  
 60 ttgctvcct tttgctcaca tggctvcgaca gatct 8435

<210> 26  
 <211> 1003  
 65 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 70 <223> Análogo de la proteína del factor B de complemento

ES 2 738 628 T3

<400> 26

5 Met Gly Ser Asn Leu Ser Pro Gln Leu Cys Leu Met Pro Phe Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 10 Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 15 Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser  
 50 55 60  
 20 Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala  
 85 90 95  
 25 Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn Gly  
 100 105 110  
 30 Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser  
 115 120 125  
 35 Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr  
 130 135 140  
 40 Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn  
 145 150 155 160  
 45 Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys  
 165 170 175  
 Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser  
 180 185 190  
 50 Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly  
 195 200 205  
 55 Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr  
 210 215 220  
 60 Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp Gly His Gly Pro Gly Glu Gln  
 245 250 255  
 65 Gln Ala Ala Ala Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr  
 260 265 270  
 70

ES 2 738 628 T3

Leu Val Leu Asp Gly Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ser Asp Phe Thr Gly  
 275 280 285  
 5 Ala Lys Lys Ser Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly  
 290 295 300  
 10 Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile  
 305 310 315 320  
 15 Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr  
 325 330 335  
 20 Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly  
 340 345 350  
 25 Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp  
 355 360 365  
 30 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile  
 370 375 380  
 35 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr  
 385 390 395 400  
 40 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys  
 405 410 415  
 45 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro  
 420 425 430  
 50 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn  
 435 440 445  
 55 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val  
 450 455 460  
 60 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met  
 465 470 475 480  
 65 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln  
 485 490 495  
 70 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met  
 500 505 510  
 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe  
 515 520 525  
 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu  
 530 535 540  
 Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn  
 545 550 555 560



ES 2 738 628 T3

5 Ile Asn Gly Lys Lys 565 Glu Ala Gly Ile Pro 570 Glu Phe Tyr Asp Tyr 575 Asp  
 Val Ala Leu Ile 580 Lys Leu Lys Asn Lys 585 Leu Lys Tyr Gly Gln 590 Thr Ile  
 10 Arg Pro Ile 595 Cys Leu Pro Cys Thr 600 Glu Gly Thr Thr Arg 605 Ala Leu Arg  
 15 Leu Pro 610 Pro Thr Thr Thr Cys 615 Gln Gln Gln Lys Glu 620 Glu Leu Leu Pro  
 20 Ala Gln Asp Ile Lys Ala 630 Leu Phe Val Ser Glu 635 Glu Glu Lys Lys Leu 640  
 25 Thr Arg Lys Glu Val 645 Tyr Ile Lys Asn Gly 650 Asp Lys Lys Gly Ser 655 Cys  
 Glu Arg Asp Ala 660 Gln Tyr Ala Pro Gly 665 Tyr Asp Lys Val Lys 670 Asp Ile  
 30 Ser Glu Val 675 Val Thr Pro Arg Phe 680 Leu Cys Thr Gly Gly 685 Val Ser Pro  
 35 Tyr Ala 690 Asp Pro Asn Thr Cys 695 Arg Gly Asp Ser Gly 700 Gly Pro Leu Ile  
 40 Val 705 His Lys Arg Ser Arg 710 Phe Ile Gln Val Gly 715 Val Ile Ser Trp Gly 720  
 45 Val Val Asp Val Cys 725 Lys Asn Gln Lys Arg 730 Gln Lys Gln Val Pro 735 Ala  
 His Ala Arg Asp 740 Phe His Ile Asn Leu 745 Phe Gln Val Leu Pro 750 Trp Leu  
 50 Lys Glu Lys 755 Leu Gln Asp Glu Asp 760 Leu Gly Phe Leu Arg 765 Ser Asn Thr  
 55 Lys Val 770 Asp Lys Arg Val Glu 775 Ser Lys Tyr Gly Pro 780 Pro Ser Pro Ser  
 60 Ser 785 Pro Ala Pro Glu Phe 790 Leu Gly Gly Pro Ser 795 Val Phe Leu Phe Pro 800  
 65 Pro Lys Pro Lys Asp 805 Thr Leu Met Ile Ser 810 Arg Thr Pro Glu Val Thr 815  
 Cys Val Val Val 820 Asp Val Ser Gln Glu 825 Asp Pro Glu Val Gln 830 Phe Asn  
 70

ES 2 738 628 T3

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 835 840 845  
 5 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 850 855 860  
 10 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 865 870 875 880  
 15 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 885 890 895  
 20 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 900 905 910  
 25 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 915 920 925  
 30 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 930 935 940  
 35 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 945 950 955 960  
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 965 970 975  
 40 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 980 985 990  
 45 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 995 1000  
 50 <210> 27  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 1 5 10 15  
 55 Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 20 25 30  
 60 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 35 40 45  
 65 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 50 55 60  
 70 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 65 70 75 80

ES 2 738 628 T3

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 85 90 95  
 5  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 100 105 110  
 10  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 115 120 125  
 15  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 130 135 140  
 20  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 145 150 155 160  
 25  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 165 170 175  
 30  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 180 185 190  
 35  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 195 200 205  
 40  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 210 215 220  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 225 230 235

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido, que comprende un análogo de proteína del factor B del complemento, en el que  
 5 (A) el análogo del factor B del complemento comprende una sustitución de un aminoácido de cisteína libre;  
 (B) la cisteína libre corresponde al aminoácido 292 de la SEQ ID NO: 1, tal como se determina mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos del análogo del factor B del complemento con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;  
 (C) el análogo de la proteína del factor B del complemento humano es al menos 90% idéntica a los aminoácidos 26-764 de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; a los aminoácidos 26-990 de las SEQ ID NOs: 22 o 23; a los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o a los aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26; y  
 10 (D) dicho análogo de la proteína del factor B del complemento ha aumentado la afinidad de unión a C3b, en comparación con una proteína del factor B del complemento nativa correspondiente codificada por un genoma de mamífero, y dicho análogo de la proteína del factor B del complemento  
 (i) tiene una actividad de proteasa disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa;  
 15 (ii) tiene una capacidad de ser escindido por la proteína del factor D disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa; o  
 (iii) tiene una actividad de proteasa disminuida en comparación con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa y tiene una capacidad de ser escindido por una proteína del factor D disminuida en comparación  
 20 con la correspondiente proteína del factor B del complemento nativa; o  
 (iv) puede competir con un factor B nativo por la unión al factor D.
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que la cisteína libre está sustituida por más de un aminoácido.
- 25 3. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento es un análogo de la SEQ ID NO: 4 y el análogo de la proteína del factor B del complemento tiene aminoácidos de cisteína que forman enlaces disulfuro y un aminoácido de cisteína libre ha sido sustituido por otro aminoácido.
- 30 4. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cisteína libre está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina.
5. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento es un análogo de la proteína del factor B del complemento humano.
- 35 6. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende mutaciones que corresponden a K258A, R259A, K260A, D279G y N285D de la SEQ ID NO: 1, tal como se determina mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos del análogo del factor B del complemento con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 40 7. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento no comprende los aminoácidos 481-764 de la SEQ ID NO: 2.
- 45 8. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento humano es al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a los aminoácidos 26-764 de las SEQ ID NOs: 1, 2 o 3; a los aminoácidos 26-990 de las SEQ ID NOs: 22 o 23; a los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2; o a los aminoácidos 26-1003 de la SEQ ID NO: 26.
- 50 9. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende la SEQ ID NO: 2, 3, 22, 23, 26, o los aminoácidos 1-480 de la SEQ ID NO: 2; o en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento comprende los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23, o los aminoácidos 26-1009 de la SEQ ID NO: 26; o en el que el análogo de la proteína del factor B del complemento consiste esencialmente en los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-764 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 26-480 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 22, los aminoácidos 26-990 de la SEQ ID NO: 23 o los aminoácidos 26-1009 de la SEQ ID NO: 26.
- 55 60

10. Polipéptido, según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende un dominio Fc de inmunoglobulina; preferiblemente en el que el dominio Fc está C-terminal al análogo del factor B del complemento.
- 5 11. Ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. Vector viral que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 11; preferiblemente en el que dicho vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector viral del herpes, un vector viral de la hepatitis, un vector viral de SV40, un vector de VAA, un vector de VEB y un vector de VEN; preferiblemente en el que dicho vector lentiviral es un vector VIB, VIH, VAIE, VIS o VIF.
- 10 13. Preparación farmacéutica que comprende el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el ácido nucleico, según la reivindicación 11, el vector viral según la reivindicación 12 o cualquier combinación de los mismos.
- 15 14. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o un ácido nucleico según la reivindicación 11, o un vector viral según la reivindicación 12, o una preparación farmacéutica según la reivindicación 13, o cualquier combinación de los mismos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad medida por complemento en un paciente, en el que el polipéptido inhibe la actividad del complemento;
- 20 preferiblemente en el que la enfermedad mediada por el complemento se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedades relacionadas con el sistema inmune, enfermedades relacionadas con la autoinmunidad, lupus nefritis, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis, enfermedades reumatológicas, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, lesión intestinal y renal posterior a la I/R, asma, síndrome hemolítico-urémico atípico, glomerulonefritis membranoproliferativa Tipo II, glomerulonefritis no proliferativa, pérdida del feto, lesión cerebral, daño postraumático de órganos, daño postinfarto de órganos, vasculitis, angioedema hereditario, hemoglobinuria paroxística nocturna, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer, rechazo de trasplante, infecciones, sepsis, choque séptico, síndrome de Sjögren, miastenia grave, enfermedades de la piel mediadas por anticuerpos, diabetes mellitus Tipo I y Tipo II, síndrome de resistencia a la insulina, diabetes gestacional, tiroiditis, púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica, neuropatías, esclerosis múltiple, lesión de derivación cardiopulmonar, poliarteritis nodosa, púrpura de Henoch Schonlein, enfermedad del suero, enfermedad de Goodpasture, vasculitis necrotizante sistémica, glomerulonefritis posestreptocócica, fibrosis pulmonar idiopática, glomerulonefritis membranosa, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de dificultad respiratoria en adultos y reperfusión, preferiblemente en el que la enfermedad mediada por el complemento es una enfermedad del ojo, tal como degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), atrofia geográfica, AMD húmeda, infarto de miocardio, AMD seca, formación de drusas, artritis, apoplejía, lesión por reperfusión isquémica, retinopatía diabética, vitreoretinopatía, lesión traumática de órganos, inflamación de la córnea, neovascularización de la córnea, uveítis, hipertensión ocular o glaucoma; preferiblemente en el que la composición farmacéutica se administra al ojo; preferiblemente en el que la composición farmacéutica se administra mediante inyección intravítrea, inyección subretinal, inyección a la cámara de intraanterior del ojo, inyección o aplicación localmente a la córnea, inyección subconjuntival, inyección subtenoniana, o mediante gotas para los ojos.
- 30 35 40 45 15. Célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11, en la que la célula expresa el polipéptido; preferiblemente en la que la célula es una célula de mamífero; preferiblemente en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula 293, una célula CHO, una célula PerC6 o una célula Vero.

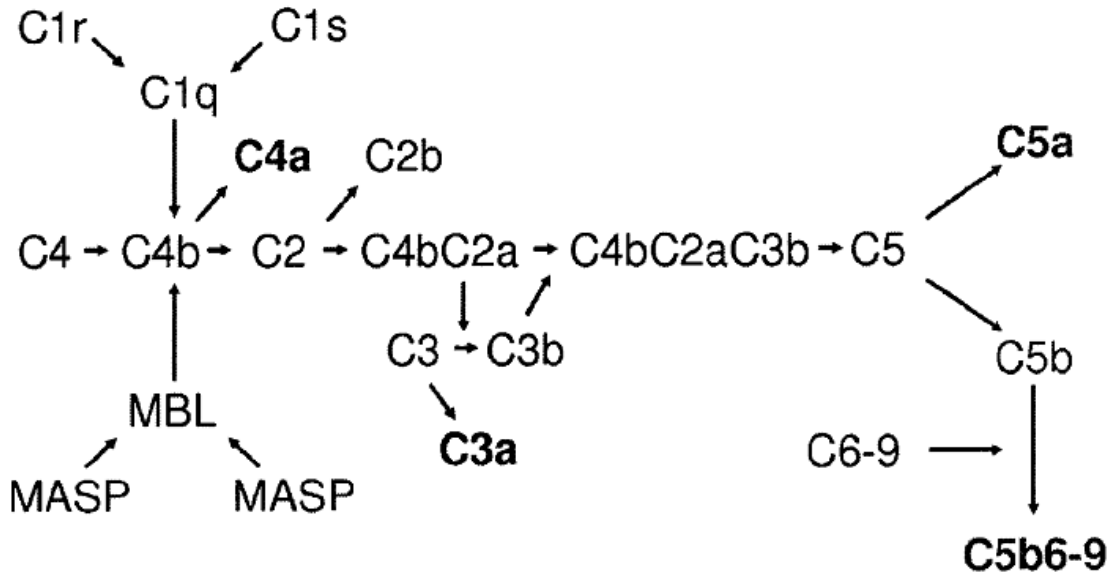


Figura 1A

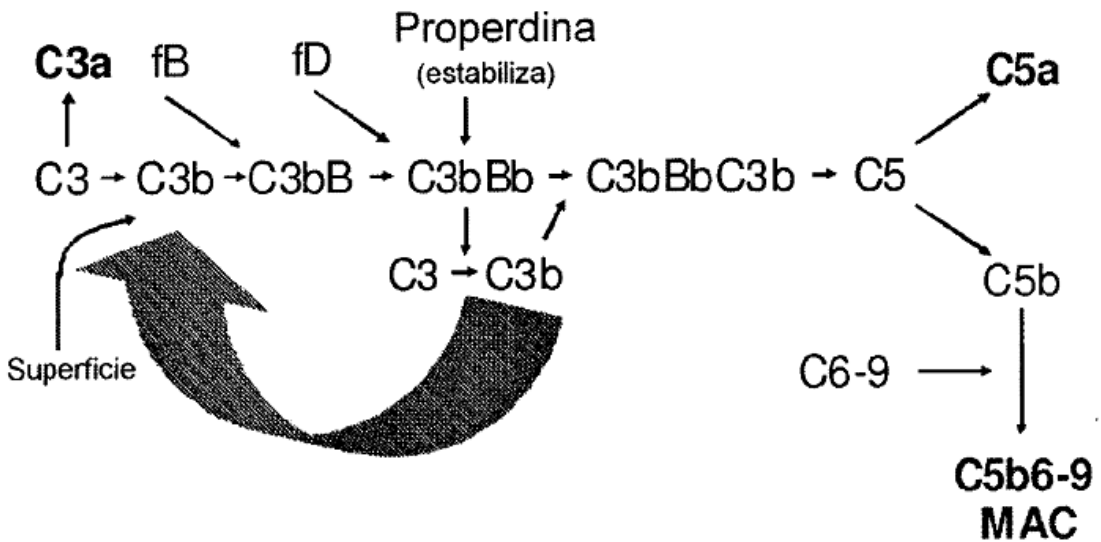


Figura 1B

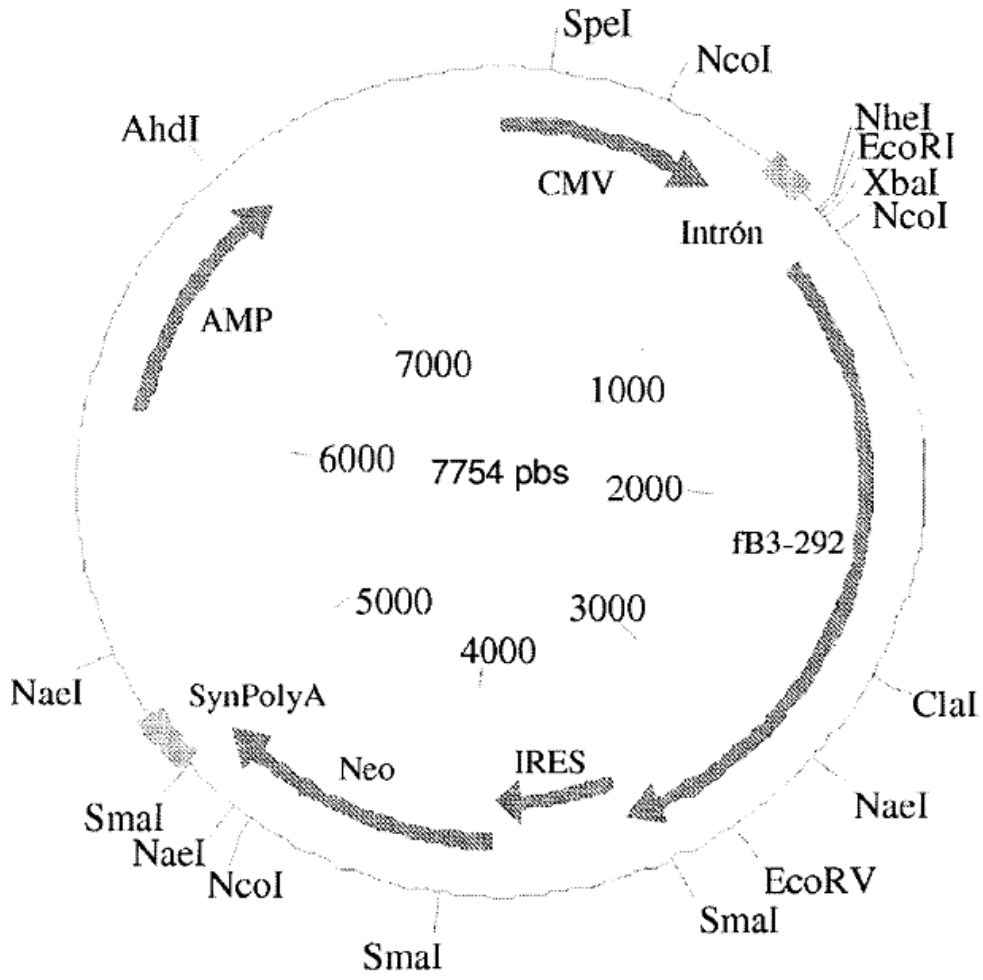


Figura 2

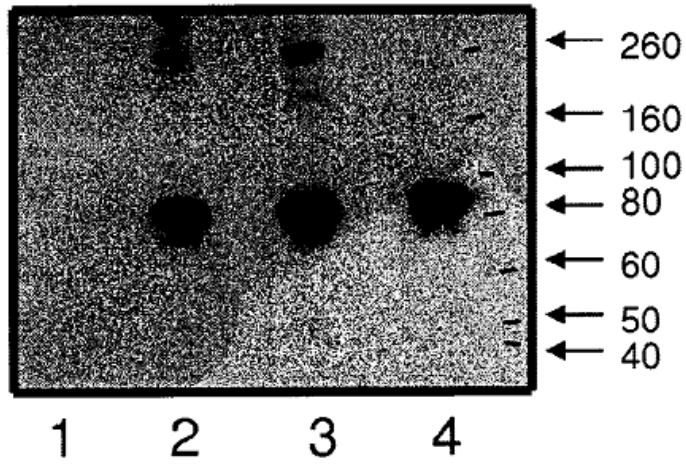


Figura 3

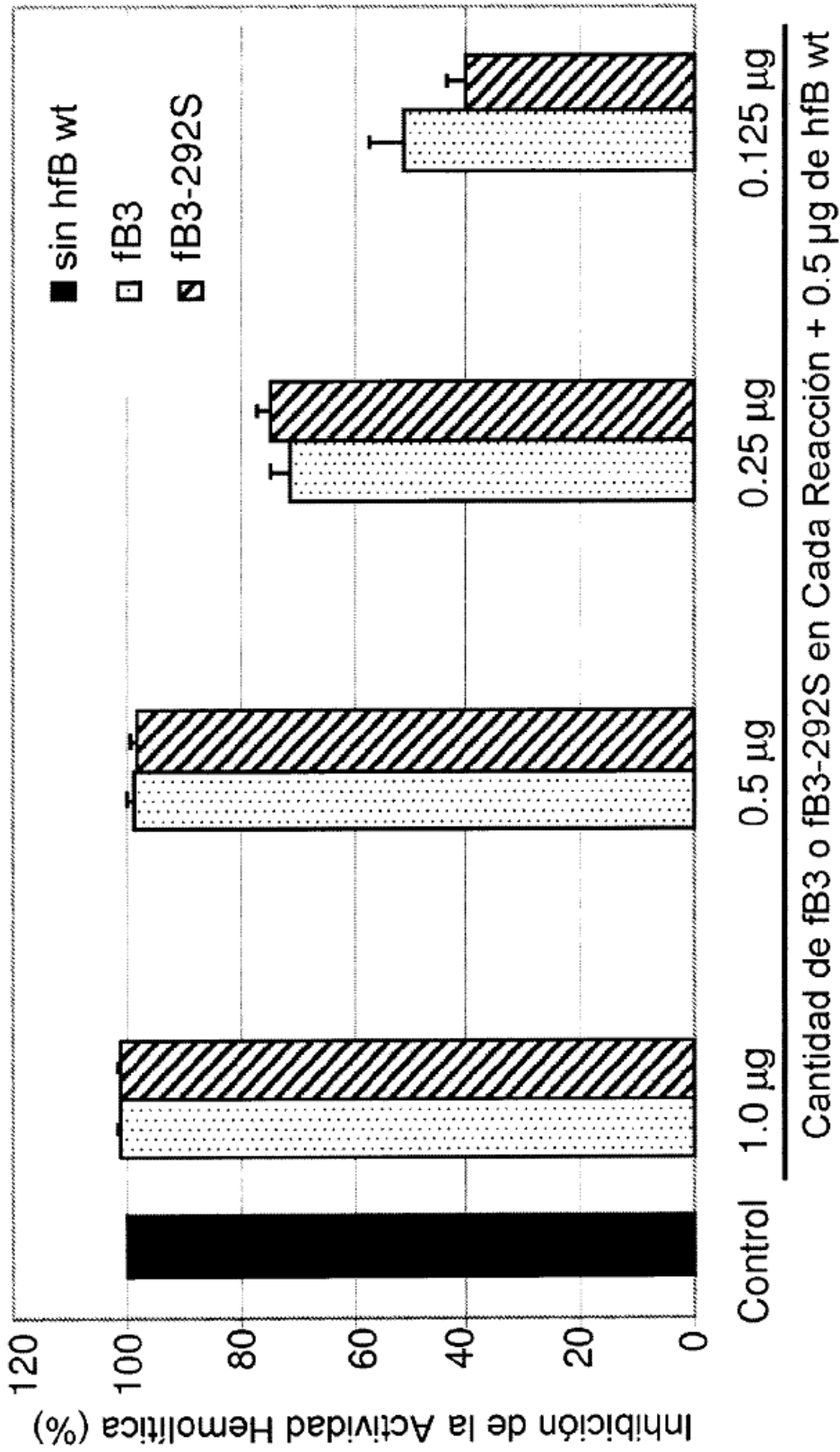


Figura 4

Cantidad de fB3 o fB3-292S en Cada Reacción + 0.5 µg de hfB wt



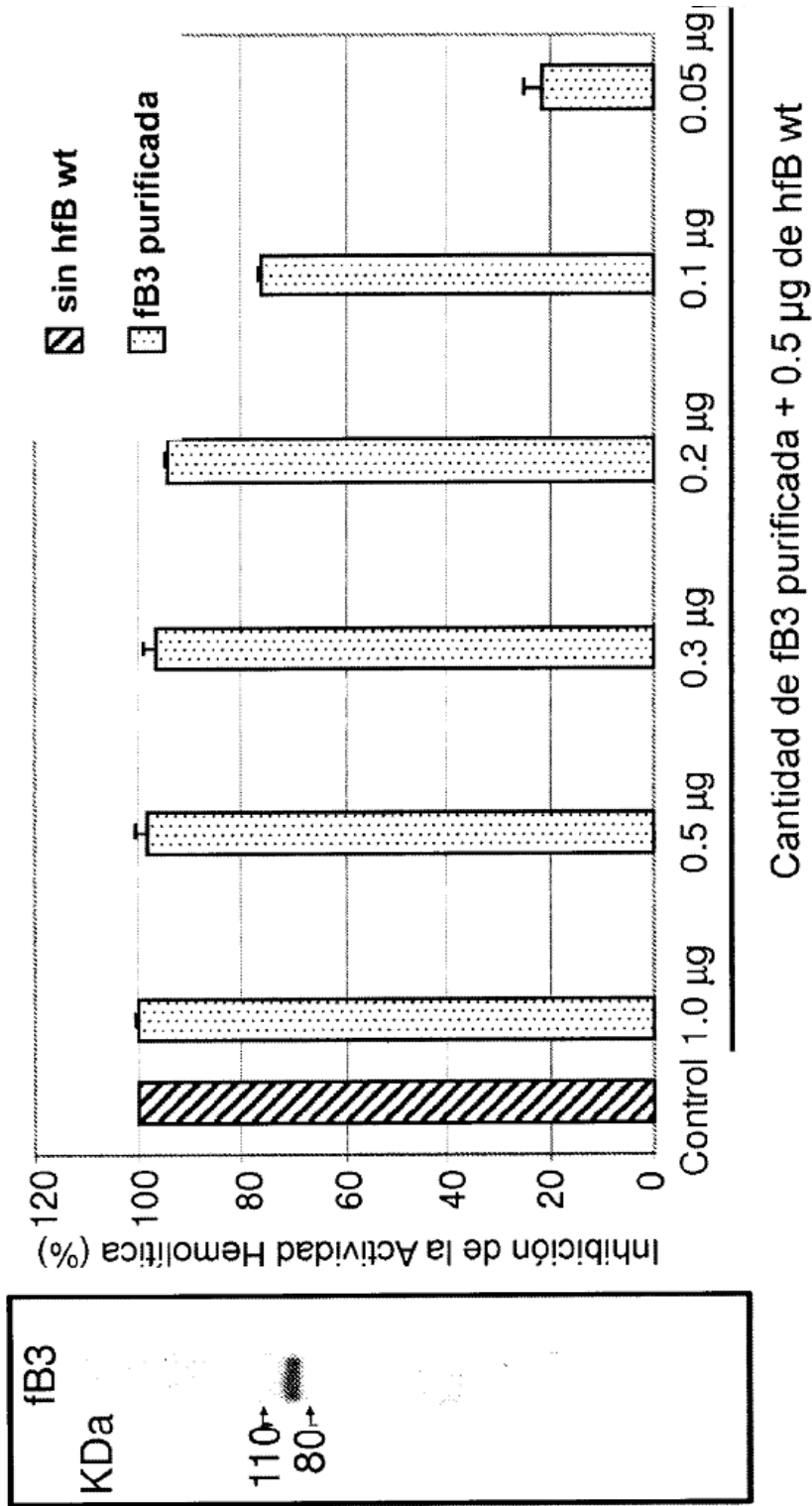


Figura 5A

Figura 5B

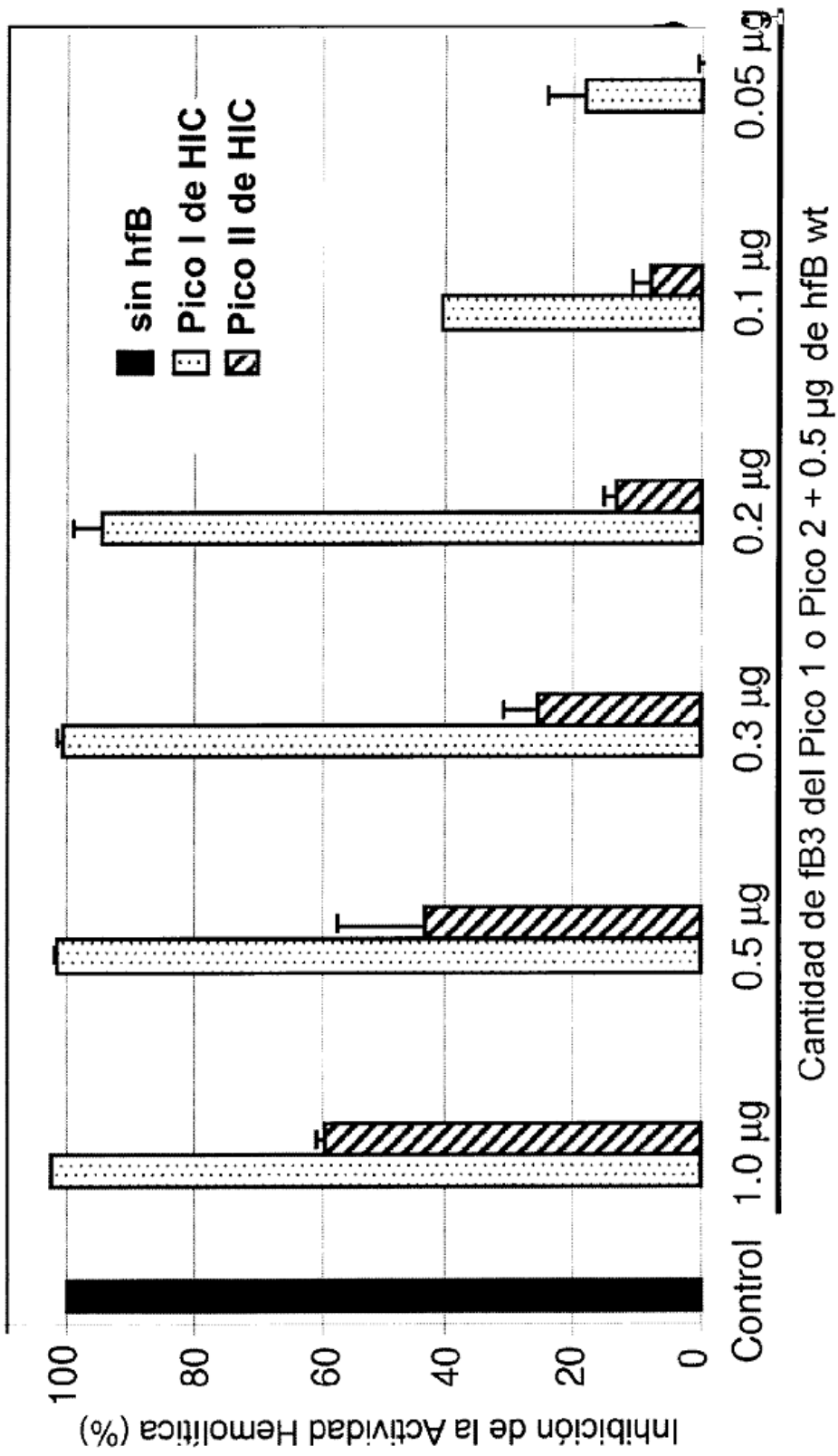


Figura 6

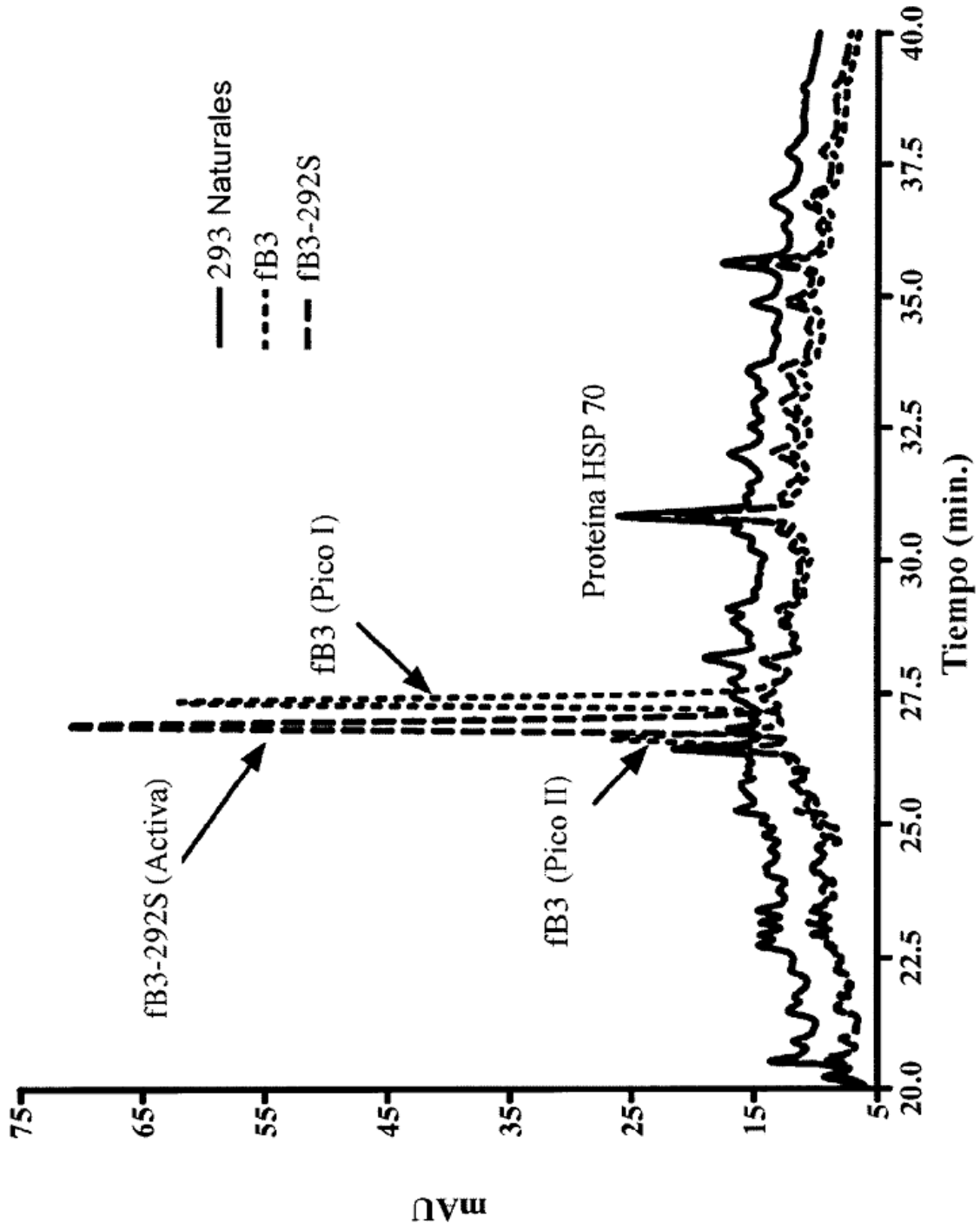


Figura 7A

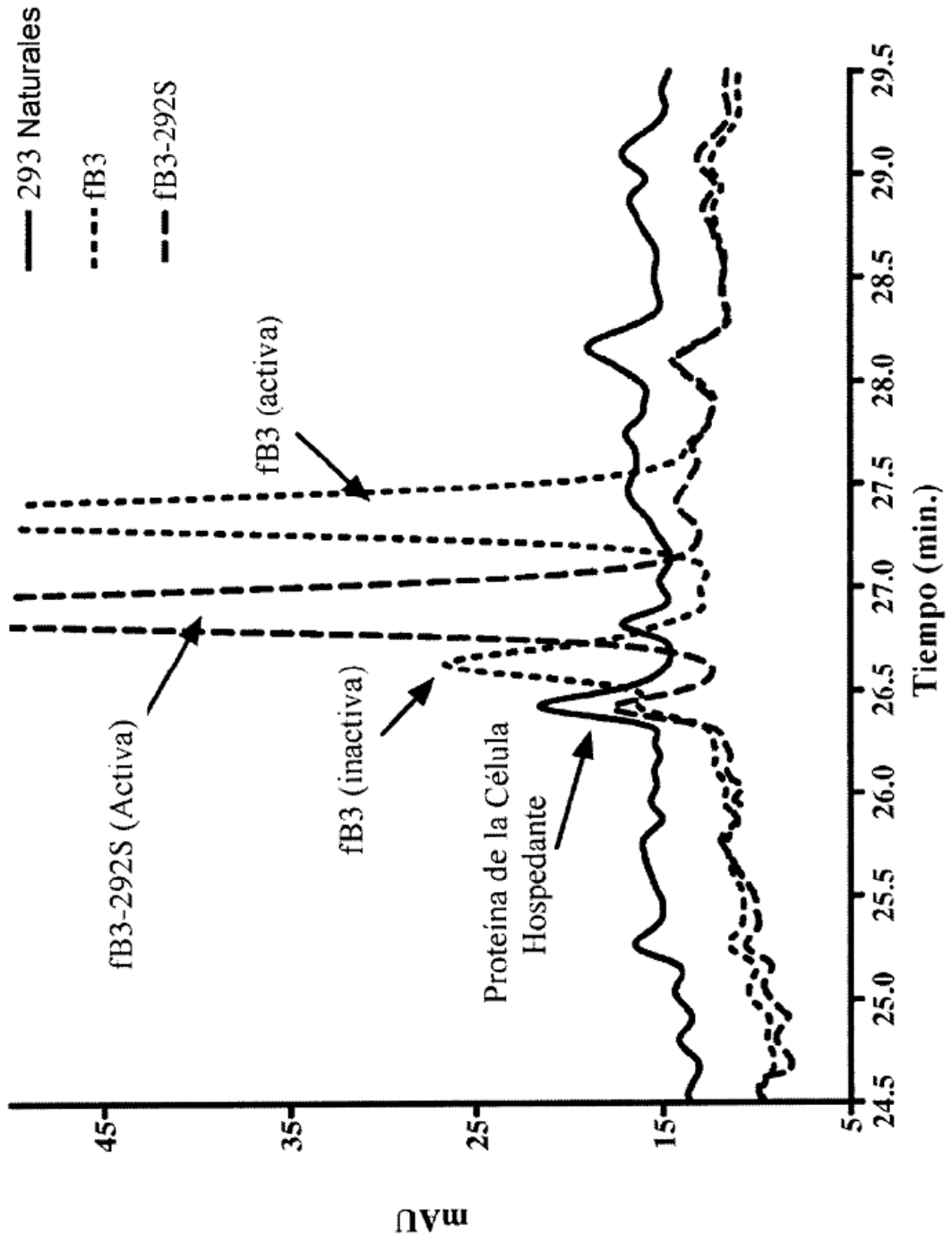
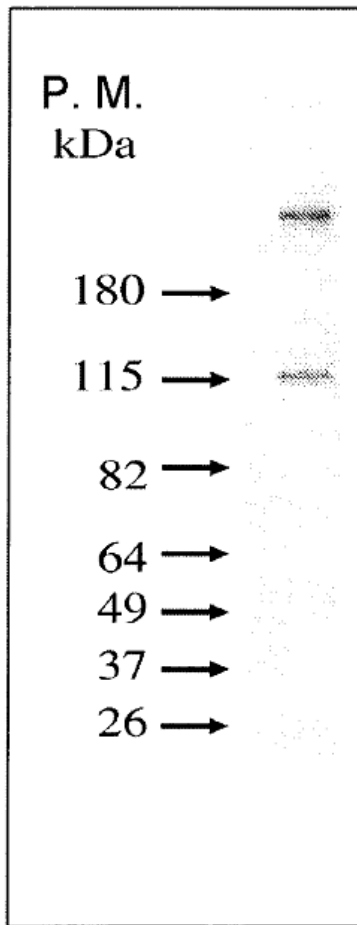
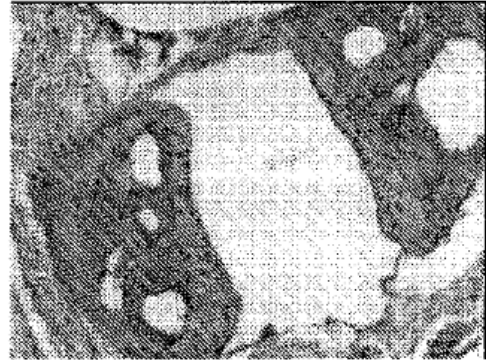


Figura 7B

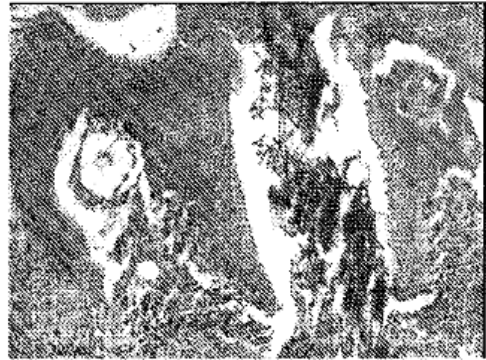


**Figura 8**

**Grupo 1**



**Grupo 2**



**Grupo 3**



**Figura 9**

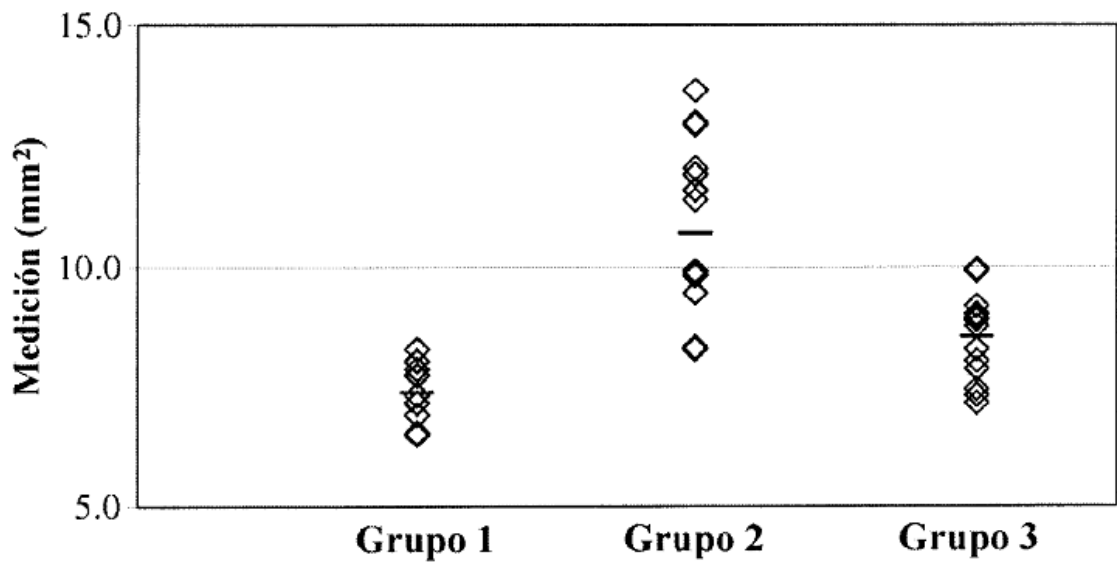


Figura 10

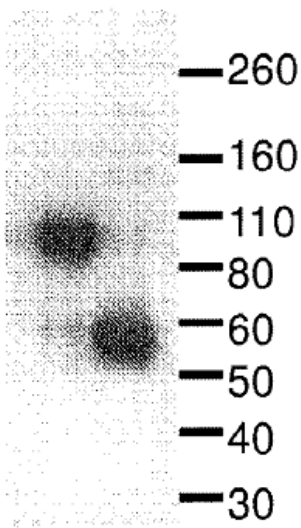


Figura 11

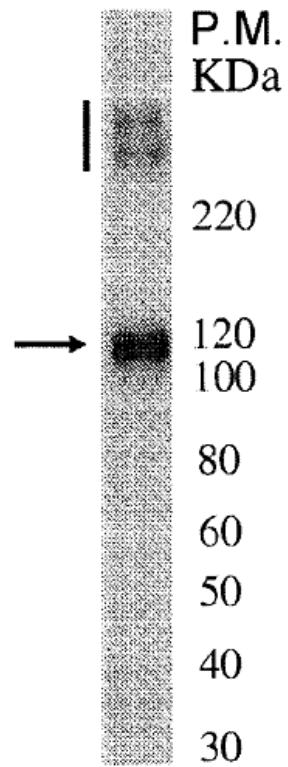


Figura 12

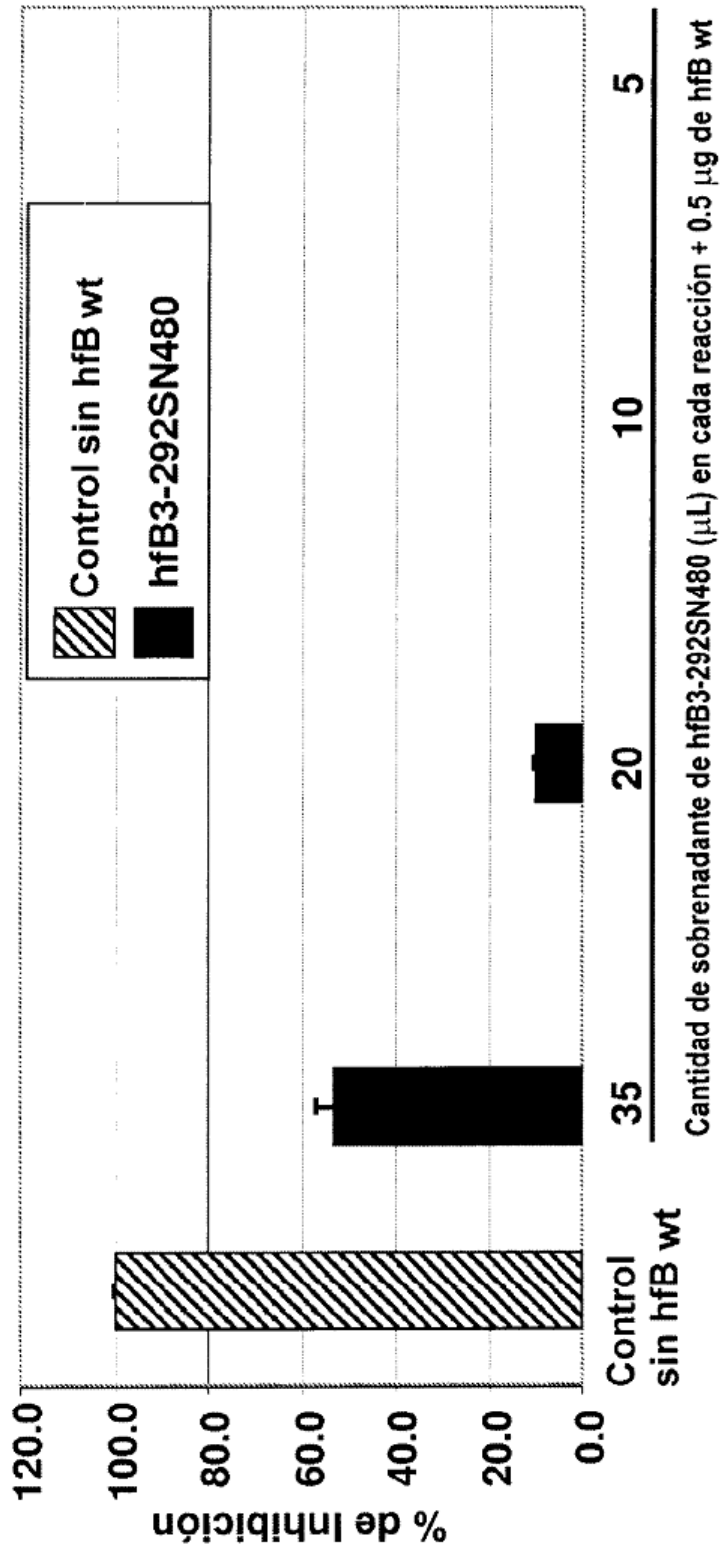


Figura 13

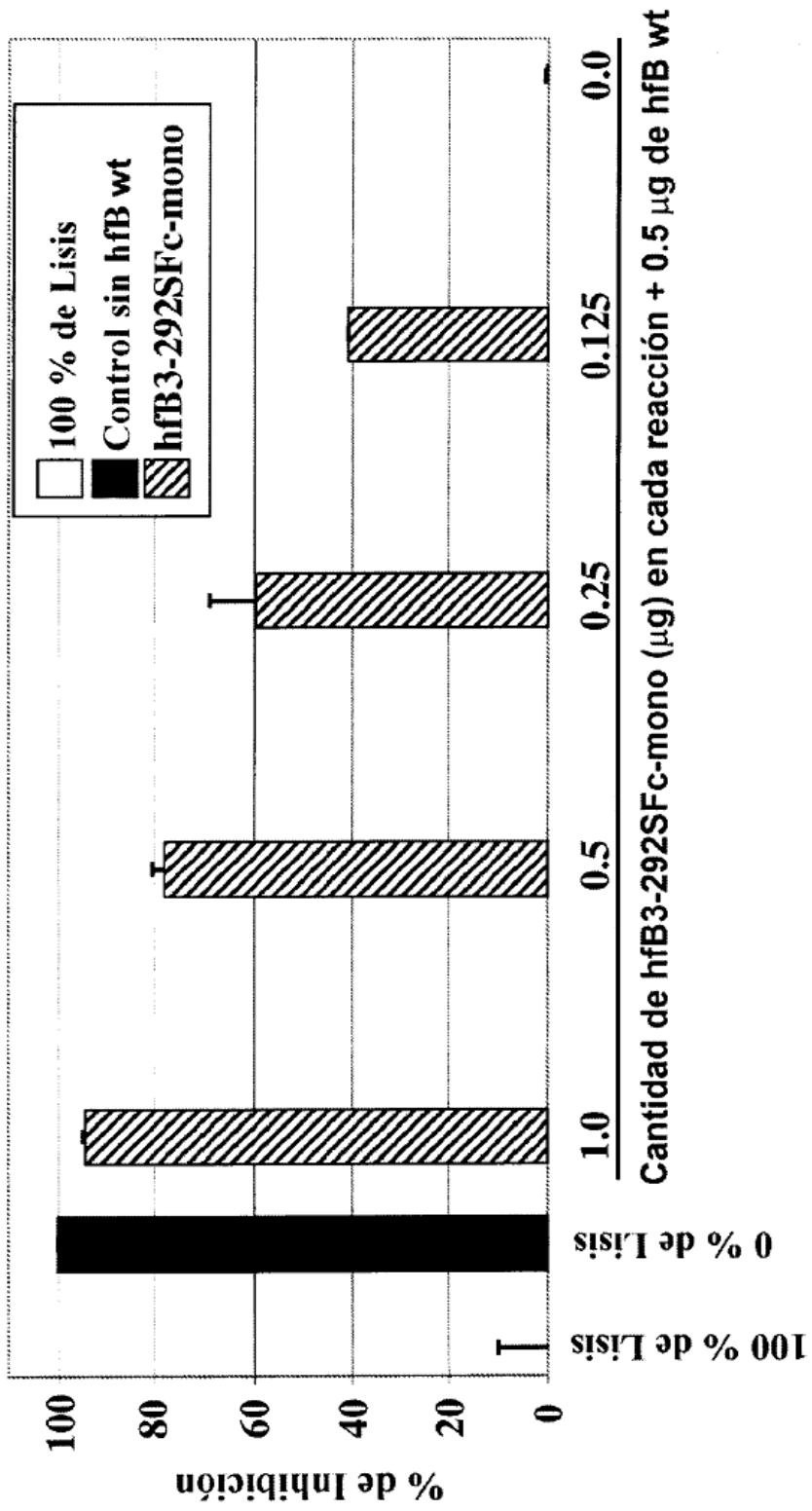


Figura 14