



No. 13-108968- -00000-0000

Fecha: 2013-04-30 11:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ POLIPEPTIDOS QUE SE UNEN AL COMPONENTE DE

COMPLEMENTO HUMANO C5

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO _____ CHESHIRE, CONNECTICUT, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-108968- -00000-0000 Fecha: 2013-04-30 11:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 103 de radicación
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/054143	Fecha 2011/09/30
Publicación Internacional No.		WO 2012/044893 A1	Fecha 2012/04/05
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
POLIPÉPTIDOS QUE SE UNEN AL COMPONENTE DE COMPLEMENTO HUMANO C5			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 039/000, C07K 016/018, C07K 016/046, C12N 015/013			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		352 Knotter Drive, Cheshire, Connecticut 06410, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Cheshire	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Connecticut	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	Estado de Delaware, Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		Nombres	NACIONALIDAD
1. GIES		David	Estadounidense
2. HUNTER		Jeffrey W.	Estadounidense
3. SPRINGHORN		Jeremy P.	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos de América	Connecticut	Beacon Falls	43 Stoddard Place, Beacon Falls, Connecticut 06403,
2. Estados Unidos de América	Connecticut	New Britain	125 Carlton Street, New Britain, Connecticut 06053,
3. Estados Unidos de América	Connecticut	Guilford	150 Ironwood Road, Guilford, Connecticut 06437,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO <u>cavelier@cavelier.com</u>
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN U.S.A.		CÓDIGO PAÍS US	(31) NÚMERO 61/388,902
(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/10/01			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-0035826	Fecha: 2013/04/16
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <u>Luz Clemencia De Páez</u>	
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>69</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>63</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>2</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

FIGURA CARACTERISTICA

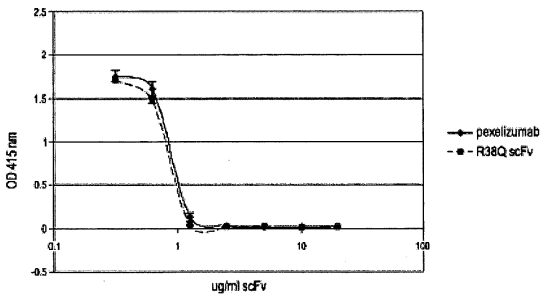


FIG. 1

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/054143
- (22) International Filing Date:
30 September 2011 (30.09.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/388,902 1 October 2010 (01.10.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ALEX-
ION PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 352
Knotter Drive, Cheshire, CT 06410 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): GIES, David
[US/US]; 43 Stoddard Place, Beacon Falls, CT 06403
(US). HUNTER, Jeffrey, W. [US/US]; 125 Carlton
Street, New Britain, CT 06053 (US). SPRINGHORN,
Jeremy, P. [US/US]; 150 Ironwood Road, Guilford, CT
06437 (US).
- (74) Agents: VARMA, Anita et al.; Ropes & Gray LLP, Pru-
dential Tower, 800 Boylston Street, Boston, MA 02199
(US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: POLYPEPTIDES THAT BIND TO HUMAN COMPLEMENT COMPONENT C5

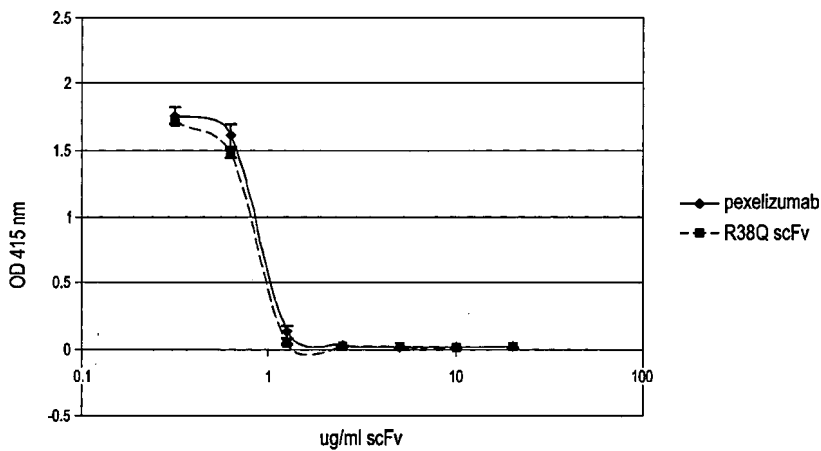


FIG. 1

(57) Abstract: The present disclosure relates to, *inter alia*, C5-binding polypeptides and use of the polypeptides in methods for treating or preventing complement-associated disorders. Also featured are therapeutics kits containing one or more of the C5-binding polypeptides and means for administering the polypeptides to a subject.

POLIPÉPTIDOS QUE SE UNEN AL COMPONENTE DE COMPLEMENTO

HUMANO C5

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

5

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente provisional Estadounidense número de serie 61/388,902 presentada en Octubre 1, 2010, cuya descripción se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad.

10 Campo Técnico

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

15 Antecedentes

El sistema de complemento actúa en conjunto con otros sistemas inmunológicos del cuerpo para defender contra la intrusión de patógenos víricos y celulares. Existen por lo menos 25 proteínas de complemento, que se encuentran como una recolección de complejo de proteínas de plasma y cofactores de membrana. Las proteínas de plasma constituyen aproximadamente 10% de las globulinas en suero de los vertebrados. Los componentes de complemento alcanzan sus funciones defensivas inmunológicas al interactuar en una serie de eventos de unión de membrana y división enzimática precisos pero complejos. La cascada de complemento resultante conduce a la creación de productos con funciones opsonicas, inmunoregulatoras, y líticas. Se proporciona un resumen conciso de las actividades biológicas asociadas con la activación de complemento, por ejemplo, en The Merck Manual, 16 Edición.

La cascada de complemento puede progresar por medio de la ruta clásica (CP), la ruta de lectina, o la ruta alternativa (AP). La ruta de lectina se inicia normalmente con la unión de lectina de unión a mannososa (MBL) a sustratos de mannososa altos. El AP puede ser el anticuerpo independiente, y se puede iniciar mediante ciertas moléculas sobre las superficies del patógeno. El CP se inicia normalmente mediante el reconocimiento de anticuerpo de, y la unión a, un sitio antigénico sobre una célula objetivo. Estas rutas convergen en la convertasa C3- el punto en donde componente de complemento C3 se divide por una proteasa activa para producir C3a y C3b.

La convertasa AP C3 se inicia mediante hidrólisis espontánea del componente de complemento C3, que es abundante en el plasma en la sangre. Este proceso, también conocido como "tickover", ocurre a través de la división espontánea de un enlace de tioéster en C3 para formar C3i o C3(H₂O). El

"tickover" se facilita por la presencia de superficies que soportan la unión del C3 activo y/o tiene características de carga neutra o positiva (por ejemplo, superficies de célula bacteriana). Esta formación de C3(H₂O) permite la unión del Factor B de proteína de plasma, que a su vez permite que el Factor D para dividir el Factor B en Ba y Bb. El fragmento Bb permanece unido a C3 para formar un complejo que contiene C3(H₂O)Bb - la convertasa C3 de "fase fluida" o de "inicio". Aunque solo producida en cantidades pequeñas, la convertasa C3 de fase fluida puede dividir múltiples proteínas C3 en C3a y C3b y resulta en la generación de C3b y su unión covalente posterior a una superficie (por ejemplo, una superficie bacteriana). El Factor B unido al C3b unido a la superficie se divide por el Factor D para formar así el complejo de convertasa C3 AP unido a la superficie que contiene C3b, Bb. (Véase, por ejemplo, Muller-Eberhard (1988) Ann Rev Biochem 57:321-347).

La convertasa C5 AP - (C3b)₂Bb - se forma luego de la adición de un segundo monómero C3b a la convertasa C3 AP. (Véase, por ejemplo, Medicus et al. (1976) J Exp Med 144: 1076-1093 y Fearon et al. (1975) J Exp Med 142:856-863). La función de la segunda molécula C3b es unirse a C5 y se presenta para la división por Bb. (Véase, por ejemplo, Isenman et al. (1980) J Immunol 124:326-331). Las convertasas AP C3 y C5 se estabilizan mediante la adición de properdina de proteína trimérica como se describe en, por ejemplo, Medicus et al. (1976), supra. Sin embargo, no se requiere unión de properdina para formar una convertasa C3 o C5 de ruta alternativa funcional. Véase, por ejemplo, Schreiber et al. (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75: 3948-3952 y Sissons et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77: 559-562.

La convertasa CP C3 se forma luego de la interacción del componente de complemento C1, que es un complejo de Clq, Clr, y C1s, con un anticuerpo que se une a un antígeno objetivo (por ejemplo, un antígeno microbiano). La unión de la porción Clq de C1 al complejo de anticuerpo-antígeno provoca un cambio conformacional en C1 que activa Clr. El Clr activo luego divide los C1 asociados con C1 para generar por lo tanto una proteasa de serina activa. Los C1 activos dividen el componente de complemento C4 en C4b y C4a. Como el C3b, el fragmento C4b nuevamente generado contiene un tiol altamente reactivo que forma fácilmente enlaces de amida o éster con moléculas adecuadas en una superficie objetivo (por ejemplo, una superficie de célula microbiana). Los C1 también dividen el componente de complemento C2 en C2b y C2a. El complejo formado por C4b y C2a es la convertasa CP C3, que es capaz de procesar C3 en C3a y C3b. La convertasa CP C5 - C4b, C2a, C3b - se forma luego de la adición de un monómero C3b a convertasa la CP C3. (Véase, por ejemplo, Müller-Eberhard (1988), supra y Cooper et al. (1970) J Exp Med 132:775-793).

Además de su función en convertasas C3 y C5, C3b también funciona como una opsonina a través de su interacción con receptores de complemento

presentes en las superficies de células que presentan antígeno tales como macrófagos y células dendríticas. La función opsónica de C3b se considera de manera general que es una de las funciones anti-infectivas más importantes del sistema de complemento. Los pacientes con lesiones genéticas que bloquean la función C3b son propensos a infección mediante una amplia variedad de organismos patogénicos, aunque los pacientes con lesiones en la secuencia de cascada de complemento, es decir, pacientes con lesiones que bloqueen las funciones C5, se encuentra que son más propensos solo a infección por Neisseria, y entonces solo algo más propensos.

Las convertasas AP y CP C5 dividen C5, que es una globulina beta de 190 kDa encontrada en suero humano normal a aproximadamente 75 µg/ml (0.4 µM). El C5 se glucosila, con aproximadamente 1.5-3 por ciento de su masa atribuida a carbohidrato. El C5 maduro es un heterodímero de una cadena alfa 115 kDa de 999 aminoácidos que es un enlace de disulfuro a una cadena beta de 75 kDa de 655 aminoácidos. Se sintetiza C5 como un producto de proteína de precursor de cadena sencilla de un gen de única copia (Haviland et al. (1991) J Immunol. 146:362-368). La secuencia de cADN del transcripto de este gen predice un precursor pro-C5 secretado de 1658 aminoácidos junto con una secuencia líder de 18 aminoácidos (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,355,245).

El precursor pro-C5 se divide después de los aminoácidos 655 y 659, para producir la cadena beta como un fragmento de terminal amino (residuos de aminoácido +1 a 655 de la secuencia anterior) y la cadena alfa como un fragmento de terminal carboxilo (residuos de aminoácido 660 a 1658 de la secuencia anterior), con cuatro aminoácidos (residuos de aminoácido 656-659 de la secuencia anterior) eliminados entre los dos.

El C5a se divide de la cadena alfa de C5 mediante la convertasa C5 clásica o alternativa como un fragmento de terminal amino que comprende los primeros 74 aminoácidos de la cadena alfa (es decir, residuos de aminoácido 660-733 de la secuencia anterior).

Se atribuye aproximadamente 20 por ciento de la masa 11 kDa de C5a al carbohidrato. El sitio de división para la acción de convertasa está en, o inmediatamente adyacente a, el residuo de aminoácido 733 de la secuencia anterior. Un compuesto que se uniría a, o adyacente, a su sitio de división tendría el potencial de bloquear el acceso de las enzimas convertasa C5 al sitio de división y por lo tanto actuar como un inhibidor de complemento. Un compuesto que se une a C5 en el sitio distal al sitio de división también puede tener el potencial de bloquear la división C5, por ejemplo, por medio convertasa de la inhibición mediada por impedimento estérico de la interacción entre C5 y la C5. Un compuesto, en un mecanismo de acción consistente con aquel del inhibidor de

complemento saliva de garrapata OmCl, también puede evitar la división C5 al reducir la flexibilidad del dominio C345C de la cadena alfa de C5, que reduce el acceso de la convertasa C5 al sitio de división de C5. Véase, por ejemplo, Fredslund et al. (2008) Nat Immunol 9 (7): 753-760.

5

El C5 también se puede activar por medios diferentes a la actividad de convertasa C5. La digestión de tripsina limitada (véase, por ejemplo, Minta and Man (1997) J Immunol 119:1597-1602 y Wetsel and Kolb (1982) J Immunol 128:2209-2216) y tratamiento de ácido (Yamamoto and Gewurz (1978) J Immunol 120:2008 y Damerau et al. (1989) Molec Immunol 26: 1133-1142) también puede dividir C5 y producir el C5b activo.

10

La división de C5 libera C5a, una anafilatoxina potente y factor quimiotáctico, y conduce a la formación del complejo de complemento terminal lítico, C5b-9. C5a y C5b-9 también tiene propiedades de activación de célula pleiotrópica, al amplificar la liberación de los factores inflamatorios en la dirección 3', tal como enzimas hidrolíticas, especies de oxígeno reactivo, metabolitos de ácido araquidónico y varias citoquinas.

15

La primera etapa en la formación del complejo de complemento terminal implica la combinación de C5b con C6, C7, y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula objetivo. Luego de la unión del complejo C5b-8 con varias moléculas C9, se forma el complejo de ataque de membrana (MAC, C5b-9, el complejo de complemento terminal ~TCC). Cuando suficientes números de MAC insertados en membranas de célula objetivo las aberturas que se crean (poros MAC) median la lisis osmótica rápida de las células objetivo. Las concentraciones no líticas, inferiores de MAC pueden producir otros efectos. En particular, la inserción de membrana de números pequeños de los complejos C5b-9 en células endoteliales y plaquetas puede provocar activación celular perjudicial. En algunos casos la activación puede predecir la lisis celular.

20

25

30

Como se mencionó anteriormente, C3a y C5a son anafilatoxinas. Estos componentes de complemento activados pueden activar la desgranulación de mastocitos, que libera la histamina de basófilos y mastocitos, y otros mediadores de inflamación, que resulta en contracción de músculo liso, permeabilidad vascular aumentada, activación de leucocito, y otro fenómeno inflamatorio que incluye proliferación celular que resulta en hiper celularidad. El C5a también funciona como un péptido quimiotáctico que sirve para atraer los granulocitos pro-inflamatorios en el sitio de activación de complemento.

35

40

Los receptores C5a se encuentran sobre las superficies de células epiteliales bronquiales y alveolares y células de músculo liso bronquiales. Los

receptores C5a también se han encontrado en eosinófilos, mastocitos, monocitos, neutrófilos, y linfocitos activados.

Aunque un sistema de complemento que funciona apropiadamente proporciona una defensa robusta contra microbios infecciosos, regulación inapropiada o activación de complemento que ha estado implicada en la patogenia de una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide (RA); nefritis por lupus; asma; lesión de isquemia-reperfusión; síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS); enfermedad de depósito denso (DDD); hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH); degeneración macular (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD)); hemólisis, enzimas de hígado elevadas, y síndrome de plaquetas bajas (HELLP); púrpura trombocitopénica trombótica (TTP); pérdida fetal espontánea; vasculitis inmunológica de Pauci; epidermólisis ampollar; pérdida fetal recurrente; esclerosis múltiple (MS); lesión traumática de cerebro; y lesión que resulta de infarto del miocardio, derivación cardiopulmonar y hemodiálisis. (Véase, por ejemplo, Holers et al. (2008) Immunological Reviews 223:300-316). Se ha demostrado que la inhibición de complemento (por ejemplo, inhibición de: formación de complemento terminal, división C5, o activación de complemento) es efectiva para tratar diversos trastornos asociados con complemento en modelos de animal y en humanos. Véase, por ejemplo, Rother et al. (2007) Nature Biotechnology 25(11):1256-1264; Wang et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:8563-8568; Wang et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:8955-8959; Rinder et al. (1995) J Clin Invest 96: 1564-1572; Kroshus et al. (1995) Transplantation 60:1194-1202; Homeister et al. (1993) J Immunol 150: 1055-1064; Weisman et al. (1990) Science 249: 146-151; Amsterdam et al. (1995) Am J Physiol 268:H448-H457; y Rabinovici et al. (1992) J Immunol 149: 1744 1750.

Resumen

La descripción se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento por los inventores que un cambio de aminoácido único en un anticuerpo de cadena sencilla anti-C5, pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT), confiere ventajas fisicoquímicas significativas para el anticuerpo. (Pexelizumab, que es una versión de cadena sencilla de eculizumab de anticuerpo completo, se describe en detalle en, por ejemplo, Whiss (2002) Curr Opin Investig Drugs 3(6):870-7; Patel et al. (2005) Drugs Today (Bare) 41(10):165-70; Thomas et al. (1996) Mol Immunol 33(17-18): 1389-401; y patente Estadounidense no. 6,355,245). Es decir, al substituir la arginina (R) en la posición 38 (de acuerdo con la numeración Kabat y el número de secuencia de aminoácidos establecido en la SEQ ID NO: 2) de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo pexelizumab con una glutamina (Q), los inventores observan, entre otras cosas, un cambio dramático en el punto isoeléctrico (pi) del anticuerpo. (Véase Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest." Publicación NIH No. 91-

3242, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD). Como se predice utilizando el software de análisis de secuencia, el pI de pexelizumab es aproximadamente 6.55, mientras que el pI de la forma sustituida R38Q del anticuerpo es 5.45. El anticuerpo sustituido por R38Q se puede formular en la solución hasta aproximadamente 50 mg/mL en pH neutro, mientras que pexelizumab alcanza un límite superior de solubilidad a aproximadamente 2 mg/mL. Esto indica que la sustitución R38Q confiere un aumento significativo en la solubilidad del anticuerpo.

La solubilidad aumentada en la solución acuosa del anticuerpo sustituido con R38Q, cuando se compara con la solubilidad de pexelizumab, es benéfico por diversas razones. Primero, para aplicaciones terapéuticas que requieren el anticuerpo se administra a un sujeto en un volumen pequeño (por ejemplo, administración intraocular, intrapulmonar, intra-articular, o subcutánea), eficacia terapéutica frecuentemente enciende la cantidad de anticuerpo que se puede administrar en volumen pequeño. Este requerimiento terapéutico necesita la formulación del anticuerpo en altas concentraciones, por ejemplo, soluciones de alta concentración. Segundo, las formulaciones de anticuerpo de alta concentración pueden permitir mayor elección del paciente con respecto a la ruta de administración. Por ejemplo, si se utiliza infusión intravenosa, una formulación de alta concentración permite tiempo de infusión más corto. Para aplicaciones terapéuticas que requieren administración frecuente y/o crónica, la ruta subcutánea de suministro se hace posible mediante formulaciones de alta concentración y puede ser más atractivo para los pacientes que la infusión intravenosa. Por la capacidad, la capacidad de formular el anticuerpo en altas concentraciones puede aumentar el cumplimiento de administración al proporcionar una administración casera fácil alternativa en pacientes con trastornos asociados con complemento. Otros beneficios de formulaciones de alta concentración incluyen, por ejemplo, ahorros en los costos de fabricación para reducir el espacio de almacenamiento en volumen y/o el número de rellenos de producto.

Como se establece en detalle en los ejemplos de trabajo, la sustitución R38Q, sin embargo, no afecta significativamente la afinidad del anticuerpo para C5, ni afecta significativamente la actividad del anticuerpo como pexelizumab y el anticuerpo sustituido por R38Q evita la hemólisis de los glóbulos rojos cuando se evalúa en un ensayo hemolítico.

De acuerdo con lo anterior, la descripción proporciona polipéptidos de unión a C5 que tienen, inter alia, una o más de las características mejoradas mencionadas anteriormente. Los polipéptidos también son capaces de inhibir, por ejemplo, la división de C5 a fragmentos C5a y C5b, y evitando así la formación del complemento terminal así como también la respuesta inflamatoria dependiente de

C5a. Sin embargo, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí también son útiles en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden utilizar para tratar o evitar afecciones asociadas con complemento que incluyen, sin limitación, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome urémico hemolítico atípico, degeneración macular relacionada con la edad (por ejemplo, AMD en forma seca o húmeda), rechazo de injerto, artritis reumatoide, asma, lesión de isquemia-reperfusión, síndrome urémico hemolítico atípico, púrpura trombocitopénica trombótica, hemoglobinuria nocturna paroxismal, enfermedad de depósito denso, pérdida fetal espontánea, vasculitis inmunológica de Pauci, epidermólisis ampollar, pérdida fetal recurrente, esclerosis múltiple, lesión traumática de cerebro, miastenia gravis (MG), enfermedad por crioaglutininas, dermatomiositis, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes tipo I, soriasis, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Goodpasture, neuropatía motriz multifocal, neuromielitis óptica, síndrome de antifosfolípido, enfermedad de Degos, afección pulmonar asociada con complemento (por ejemplo, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), síndrome de antifosfolípido catastrófico, o cualquier otra afección asociada con complemento descrita aquí y/o conocida en la técnica.

En un aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que se une a una proteína de componente de complemento humano C5. El polipéptido puede comprender, o consistir de, la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí no es un anticuerpo completo. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí es un anticuerpo de cadena sencilla.

"Polipéptido," "péptido," y "proteína" se utilizan intercambiabilmente y significan cualquier cadena ligada a péptido de aminoácidos, independiente de la longitud o modificación post-traducciona.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido de unión a C5 que comprende una secuencia de aminoácidos que es mayor de 50 (por ejemplo, mayor de o igual a 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99) % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, pero contiene la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido, que se une a la proteína de componente de complemento humano C5 y comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2; pero con no más de 30 (por ejemplo, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser

conservadoras o no conservadoras. Sin embargo, el polipéptido comprende la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2.

Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina, y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye por lo menos 20 (por ejemplo, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 50, 52, 55, 57, 60, 62, 65, 67, 70, 72, 75, 77, 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, o 200 o más) aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 2, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la glutamina en la posición 38. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende por lo menos 20, pero menos de 246 (por ejemplo, 245, 244, 243, 242, 241, 240, 235, 230, 225, 220, 215, 210, 205, 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, o menos) aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 2, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la glutamina en la posición 38.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 son variantes de eliminación. Las variantes de eliminación pueden carecer de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o 90 o más aminoácidos únicos. Las variantes de eliminación también pueden carecer de uno o más segmentos de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o 90 o más) aminoácidos consecutivos o aminoácidos únicos no contiguos. Sin embargo, en algunas realizaciones, las variantes de eliminación pueden comprender un primer segmento que comprende aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 (inclusive de glutamina 38) y un segundo segmento que comprende aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2. Los dos segmentos de aminoácido se pueden ligar directamente o ligar mediante una secuencia de aminoácidos que es heteróloga a los aminoácidos 1-107 y 125-246 de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser una secuencia ligadora tal como, pero no limitado a, una secuencia ligadora de poliglicina o poliserina descrita en, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 5,525,491 y 5,258,498, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los ligadores de polipéptido adicionales se conocen en la técnica y se describen aquí.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí puede ser una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender uno o más segmentos de unión a C5 (por ejemplo, los segmentos de unión a C5 descritos en la SEQ ID NO: 2) y uno o más segmentos que son heterólogos a los segmentos de unión a C5. La secuencia heteróloga puede ser, por ejemplo, una etiqueta antigénica (por ejemplo, FLAG, polihistidina, hemaglutinina (HA), glutatona-S-transferasa (GST), o proteína de unión a maltosa (MBP)). Las secuencias heterólogas también pueden ser proteínas útiles como marcadores diagnósticos o detectables, por ejemplo, luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), o acetil transferasa cloramfenicol (CAT). Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un primer segmento que comprende aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 (inclusive de glutamina 38) y un segundo segmento que comprende aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2, en donde (i) el primer y segundo segmentos se conectan por una secuencia de aminoácidos heteróloga, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de ligador heterólogo y/o (ii) la proteína contiene uno o ambos de un segmento heterólogo de terminal amino y/o terminal carboxi, por ejemplo, una etiqueta antigénica de terminal carboxi, una secuencia heteróloga de terminal amino que codifica un polipéptido detectable, o cualquiera de las secuencias heterólogas descritas aquí. En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga puede ser una unidad estructural objetivo que dirige el segmento de unión a C5 a una célula, tejido, o microambiente de interés. En algunas realizaciones, la unidad estructural objetivo es una forma soluble de un receptor de complemento humano (por ejemplo, receptor de complemento humano 2) o un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla) que se une a C3b o C3d. En algunas realizaciones, la unidad estructural objetivo es un anticuerpo que se une a un antígeno específico de tejido tal como un antígeno específico de riñón.

En otro aspecto, la descripción caracteriza una construcción que comprende un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y una unidad estructural objetivo. La unidad estructural objetivo puede ser una que dirige el polipéptido de unión a C5 a un sitio de activación de complemento tal como, pero no limitado a, glóbulos rojos (por ejemplo, RBC de pacientes afligidos con una enfermedad hemolítica tal como PNH), vasculatura de un órgano trasplantado, una articulación, los pulmones, o los ojos. En algunas realizaciones, la unidad estructural objetivo es una forma soluble de un receptor de complemento, por ejemplo, una forma soluble de receptor de complemento humano 1 o receptor de complemento humano 2. En algunas realizaciones, la unidad estructural objetivo es un anticuerpo. En dichas realizaciones, la construcción es un anticuerpo biespecífico. La unidad estructural objetivo puede ser un anticuerpo que se une a C3b y/o C3d. En algunas realizaciones, la unidad estructural objetivo puede ser un anticuerpo que se une a un antígeno específico de tejido tal como un antígeno específico de riñón (por ejemplo, KIM-1).

En algunas realizaciones de cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí, los polipéptidos pueden inhibir la formación, y/o la actividad, del complemento terminal. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 puede inhibir la división de C5 en fragmentos C5a y C5b y por lo tanto reducir el depósito posterior de C5b-9 en las células y la respuesta inflamatoria mediada por C5a.

En todavía otro aspecto, la descripción caracteriza un anticuerpo de cadena sencilla que se une al componente de complemento humano C5 y tiene una solubilidad de entre aproximadamente 10 mg/mL y aproximadamente 60 mg/mL en la solución acuosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla tiene una solubilidad de entre aproximadamente 20 mg/mL y aproximadamente 50 mg/mL. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla tiene una solubilidad de entre aproximadamente 40 mg/mL y aproximadamente 55 mg/mL. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla tiene una solubilidad de aproximadamente 50 mg/mL. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla comprende o consiste de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla comprende una secuencia de aminoácidos que es mayor de 50 (por ejemplo, mayor de o igual a 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99) % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, pero con no más de 20 (por ejemplo, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) sustituciones de aminoácidos.

En otro aspecto, la descripción caracteriza: (i) un ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí (por ejemplo, variantes, variantes de eliminación, fragmentos, construcciones, anticuerpos biespecíficos, o proteínas de fusión que comprenden las secuencias de aminoácidos descritas en la SEQ ID NO: 2); (ii) un vector que contiene el ácido nucleico; (iii) una célula que comprende el ácido nucleico o el vector; y (iv) métodos para producir un polipéptido (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí) utilizando la célula. El ácido nucleico puede contener, o consistir de, la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender o consistir de nucleótidos 1-738 de la SEQ ID NO: 1. El ácido nucleico puede incluir opcionalmente una secuencia de inicio de traducción (ATG) o una secuencia de terminación de traducción (por ejemplo, TGA). El vector puede incluir el ácido nucleico ligado operablemente a una secuencia de control de expresión. Dicho vector se puede denominar aquí como "vector de expresión." El vector se puede integrar dentro del genoma de la célula o se puede mantener dentro de la célula

como un episoma. La célula puede ser, por ejemplo, una célula procariótica o una célula eucariótica. La célula puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana, una célula fúngica (por ejemplo, una célula de levadura), una célula de insecto, o una célula de mamífero (por ejemplo, una célula de conejo, una célula de ratón, una célula de rata, una célula de hámster, una célula de gato, una célula de perro, una célula de cabra, una célula de vaca, una célula de cerdo, una célula de caballo, o una célula de primate diferente a humano). En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula se transforma o se inmortaliza. En algunas realizaciones, la célula es una célula primaria. El método para producir el polipéptido (o polipéptido de fusión) incluye cultivar la célula mencionada anteriormente bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido o polipéptido de fusión mediante la célula. El método también puede incluir aislar el polipéptido o polipéptido de fusión de la célula o del medio en el que se cultiva.

En todavía otro aspecto, la descripción caracteriza un lisado celular que contiene cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí. El lisado se puede preparar de las células que expresan el polipéptido.

En otro aspecto, la descripción caracteriza una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí y un excipiente, diluyente, y/o portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción caracteriza una composición liofilizada estable que comprende cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí. En otro aspecto, la descripción caracteriza un equipo que contiene la composición liofilizada y una solución acuosa que comprende un excipiente, diluyente, y/o portador farmacéuticamente aceptable, en donde la solución es para uso en reconstituir la composición liofilizada para administración terapéutica posterior a un humano que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, a trastorno asociado con complemento.

En otro aspecto, la descripción caracteriza una solución farmacéutica que contienen cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí, en donde el polipéptido está presente (o se formula) en la solución en una concentración de entre aproximadamente 10 mg/mL a 100 mg/mL (por ejemplo, entre aproximadamente 9 mg/mL y 90 mg/mL; entre aproximadamente 9 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 10 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 110 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 80 mg/mL; entre aproximadamente 25 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 25 mg/mL y 85 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente

25 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 30 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 30 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 40 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 50 mg/mL y 100 mg/mL; o entre aproximadamente 20 mg/mL y 50 mg/mL). En algunas realizaciones, el polipéptido está presente en la solución a más de (o por lo menos o igual a) 10 (por ejemplo, mayor de, por lo menos, o igual a: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 140, o incluso 150) mg/mL. En algunas realizaciones, el polipéptido está presente en la solución en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL.

En todavía otro aspecto, la descripción proporciona un método para inhibir la formación del complemento terminal y/o C5a. El método incluye poner en contacto una muestra biológica con cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí en una cantidad efectiva para inhibir la formación del complemento terminal y/o C5a en la muestra biológica. El polipéptido de unión a C5 se puede utilizar en una cantidad que es efectiva para inhibir la formación del complemento terminal (o C5a) mediante por lo menos 20 (por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 99) %. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede utilizar en una cantidad que es efectiva para inhibir completamente la formación del complemento terminal (y/o C5a). La muestra biológica puede ser una muestra de sangre, una muestra de suero, o una muestra de plasma. La muestra biológica puede ser una obtenida de un sujeto (por ejemplo, un humano) que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con complemento. En algunas realizaciones, el método puede incluir obtener una muestra biológica del sujeto.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar un trastorno asociado con complemento, cuyo método incluye administrar a un sujeto en necesidad del mismo cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí en una cantidad efectiva para tratar un trastorno asociado con complemento en el sujeto. El polipéptido de unión a C5 se puede administrar al sujeto en una cantidad y/o con una frecuencia efectiva para inhibir la formación de suero en el sujeto del complemento terminal (y/o C5a) mediante por lo menos 20 (por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 99) %. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede administrar en una cantidad y/o con una frecuencia efectiva para inhibir completamente la formación del complemento terminal (y/o C5a). En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede administrar

al sujeto en una cantidad y/o con una frecuencia efectiva para reducir la actividad de complemento de suero en el sujeto a un nivel que es menor de o igual a 50 (por ejemplo, menor de 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) % del nivel de actividad de complemento en suero de un paciente saludable (por ejemplo, uno paciente que no está afligido con un trastorno asociado con complemento).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descrito aquí, el trastorno asociado con complemento puede ser un trastorno asociado con la ruta de complemento alternativa o un trastorno asociado con la ruta de complemento clásica. El trastorno asociado con complemento puede ser, por ejemplo, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome urémico hemolítico atípico, síndrome urémico hemolítico típico, degeneración macular relacionada con la edad, rechazo de injerto, artritis reumatoide, una afección pulmonar asociada con complemento, lesión de isquemia-reperfusión, púrpura trombocitopénica trombótica, hemoglobinuria nocturna paroxismal, enfermedad de depósito denso, degeneración macular relacionada con la edad, pérdida fetal espontánea, vasculitis inmunológica de Pauci, epidermólisis ampollar, pérdida fetal recurrente, esclerosis múltiple, lesión traumática de cerebro, miastenia gravis, enfermedad por crioaglutininas, dermatomiositis, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes tipo I, soriasis, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Goodpasture, neuropatía motriz multifocal, neuromielitis óptica, síndrome de antifosfolípido, síndrome de antifosfolípido catastrófico, y cualquier otro trastorno asociado con complemento descrito aquí o conocido en la técnica de medicina. El rechazo de injerto puede ser, por ejemplo, rechazo de injerto de riñón, rechazo de injerto de médula ósea, rechazo de injerto de piel, rechazo de injerto de corazón, rechazo de injerto de pulmón, o rechazo de injerto de hígado. La afección pulmonar puede ser, por ejemplo, asma, bronquitis, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades de pulmón intersticial, cánceres de pulmón, deficiencia de antitripsona a-1, enfisema, bronquiectasis, bronquiolitis obliterans, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, o un trastorno vascular de colágeno.

En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el polipéptido se administra intravenosamente al sujeto. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el polipéptido se administra a los pulmones el sujeto. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el polipéptido se administra al sujeto mediante inyección subcutánea. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el polipéptido se administra al sujeto por medio de inyección intraarticular. En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el polipéptido se administra al sujeto por medio de inyección intravital o intraocular. Las rutas adicionales de administración local (por ejemplo, en el ojo, una

articulación, o los pulmones de un sujeto) se describen aquí y se conocen en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos aquí, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar al ojo por medio de un parche trans-esclerótico (véase adelante).

5

En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí pueden incluir administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto. Uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar juntos como composiciones terapéuticas separadas o una composición terapéutica se puede formular para incluir: (i) uno o más polipéptidos de unión a C5 y (ii) uno o más agentes terapéuticos adicionales. Un agente terapéutico adicional se puede administrar antes de, concurrentemente, o después de la administración del polipéptido de unión a C5. Un agente adicional y un polipéptido de unión a C5 se puede administrar utilizando el mismo método de suministro o ruta o el agente y polipéptido se puede administrar utilizando diferentes métodos o rutas. Los agentes terapéuticos adicionales pueden ser de cualquiera de aquellos descritos aquí o se conocen en la técnica como que son útiles para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento.

10

15

20

En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. El sujeto puede ser, por ejemplo, un niño o una hembra.

25

30

En todavía otro aspecto, la descripción caracteriza un conjugado que comprende cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí conjugados con una unidad estructural heteróloga. La unidad estructural heteróloga puede ser el polipéptido covalentemente o no covalentemente conjugado. La unidad estructural heteróloga puede ser una etiqueta detectable tal como, por ejemplo, una etiqueta enzimática, una etiqueta radioactiva, una etiqueta fluorescente, o una etiqueta luminiscente. La unidad estructural heteróloga puede ser, por ejemplo, un primer miembro de un par de unión específico. Por ejemplo, la unidad estructural heteróloga puede ser biotina, estreptavidina, o un análogo de biotina o estreptavidina.

35

40

En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar o evitar una afección pulmonar asociada con complemento tal como, pero no limitado a, asma, bronquitis, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedades de pulmón intersticial, cánceres de pulmón, deficiencia de anti-tripsona a-1, enfisema, bronquiectasis, bronquiolitis obliterans, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, y un trastorno vascular de colágeno. Los métodos incluyen administrar a un sujeto uno o más de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí en una cantidad efectiva para tratar o evitar la afección. Uno o más polipéptidos de unión a C5, por ejemplo, se pueden administrar antes de la manifestación de la afección

pulmonar, durante la manifestación de la afección pulmonar, o después de la manifestación de la afección pulmonar. Uno o más polipéptidos de unión a C5 se pueden administrar, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, o por medio de suministro intrapulmonar. Por ejemplo, uno o más polipéptidos de unión a C5 se pueden suministrar a los pulmones del sujeto por medio de un nebulizador o inhalador. En algunas realizaciones, uno o más polipéptidos de unión a C5 se administran en conjunto con por lo menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, o cinco o más) agentes adicionales útiles para tratar o evitar un trastorno pulmonar asociado con complemento (por ejemplo, aliviar un síntoma del mismo). Por lo menos un agente adicional puede ser, por ejemplo, un corticosteroide tal como, pero no limitado a, dexametasona. Otros agentes terapéuticos adicionales adecuados para uso con los métodos descritos aquí se conocen en la técnica y se establecen aquí. Por lo menos un agente activo adicional se puede administrar antes, después, o concurrentemente con la administración de uno o más polipéptidos de unión a C5. Por lo menos un agente adicional y uno o más polipéptidos de unión a C5 se pueden administrar mediante el mismo método o ruta de suministro. Por ejemplo, un agente activo adicional y un polipéptido de unión a C5 se pueden administrar mediante el nebulizador. En algunas realizaciones, un agente y polipéptido de unión a C5 se administra mediante diferentes métodos o rutas. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar mediante infusión y un agente activo adicional se puede administrar mediante el nebulizador.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un equipo terapéutico que contiene uno o más polipéptidos de unión a C5 y significa administración intrapulmonar a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o en riesgo de desarrollar, un trastorno pulmonar asociado con complemento. El nebulizador puede ser, por ejemplo, un nebulizador de chorro de aire, un nebulizador ultrasónico, un nebulizador de malla vibradora, o un nebulizador Shockwave. El inhalador puede ser, por ejemplo, un inhalador de dosis medida (por ejemplo, un inhalador de dosis medida presurizado). La composición también puede contener opcionalmente instrucciones para cómo administrar el polipéptido de unión a C5 a un sujeto. El equipo también puede incluir uno o más agentes activos adicionales para uso en evitar o tratar un trastorno asociado con complemento en un sujeto.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un método para tratar un trastorno ocular asociado con complemento tal como, pero no limitado a, AMD húmedo y/o seco. El método incluye administrar a un sujeto afligido con un trastorno ocular asociado con complemento un polipéptido de unión a C5 descrito aquí en una cantidad y con una frecuencia para tratar el trastorno. El polipéptido de unión a C5 se puede administrar al sujeto por medio de administración intraocular o intravítreal. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede administrar tópicamente (por ejemplo, formulado como gotas para ojos o

como parte de una solución de enjuague, hidratante, y/o de limpieza para lentes de contacto) o por medio de un parche trans-esclerótico. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede administrar en conjunto con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar un trastorno ocular asociado con complemento. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede administrar con un inhibidor VEGF (por ejemplo, un anticuerpo de antagonista anti-VEGF tal como bevacizumab, ranibizumab, pegaptanib sodio, o verteporfm (véase adelante)). Como se describe en detalle adelante, el polipéptido de unión a C5 se puede administrar al mismo tiempo, antes de, o después de uno o más agentes terapéuticos adicionales.

El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr la identidad de secuencia de porcentaje máximo. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr en diversas formas que están dentro del experticio de la técnica, por ejemplo, utilizando el software de computador disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, o Megalign (DNASTAR). Para consistencia, la descripción utiliza el software BLAST disponible públicamente del Centro Nacional de Información Biotecnológica (U.S).. Los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para lograr alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias se compara se puede determinar mediante métodos conocidos.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos científicos y técnicos utilizados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por una persona medianamente versada en la técnica a la que pertenece esta descripción. En caso de conflicto, regirá el presente documento, incluyendo definiciones. Los métodos y materiales preferidos se describen adelante, aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí también se pueden utilizar en la práctica o prueba de los métodos y composiciones actualmente descritas. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad.

Otras características y ventajas de la presente descripción, por ejemplo, métodos para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos, y de las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

La **Figura 1** es una gráfica lineal que describe la inhibición dependiente de concentración de hemólisis de eritrocito de pollo mediante dos anticuerpos de cadena sencilla: pexelizumab (diamantes rellenos) y la forma sustituida R38Q de pexelizumab (cuadrados rellenos). El eje Y representa la absorbancia evidente a 415 nm como una medida de liberación de hemoglobina. El eje X representa la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de cada anticuerpo.

La **Figura 2** es una gráfica lineal que describe la inhibición dependiente de concentración de hemólisis de eritrocito de pollo mediante la forma sustituida R38Q de pexelizumab. La fuente del anticuerpo sustituido R38Q utilizado en el experimento es: (i) el anticuerpo sustituido R38Q de una solución de 50 mg/mL (diamantes rellenos); (ii) el anticuerpo sustituido R38Q de una solución de 10 mg/mL (cuadrados rellenos); o (iii) el anticuerpo sustituido R38Q de una solución 1.9 mg/mL (triángulos rellenos). El eje Y representa la absorbancia evidente a 415 nm como una medida de liberación de hemoglobina. El eje X representa la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de cada anticuerpo.

Descripción Detallada

La descripción caracteriza polipéptidos que se unen al componente de complemento C5 así como también ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos. Los polipéptidos se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas tal como métodos para tratar o evitar trastornos asociados con complemento. Aunque no pretende ser limitante, los polipéptidos de ejemplo, ácidos nucleicos, conjugados, composiciones farmacéuticas y formulaciones, y métodos para utilizar cualquiera de los anteriores se elaboran adelante y se ejemplifican en los Ejemplos de trabajo.

Composiciones

Las composiciones descritas aquí contienen uno o más polipéptidos de unión a C5 de componentes de complemento. Los polipéptidos comprenden anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a C5. Los polipéptidos de unión a C5 pueden tener una secuencia de aminoácidos que incluye, o consiste de, la siguiente secuencia:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCGASENIYGALNWDYQQKPGKAPKLLIYGATN
 LADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFGGGTKVEIK
 RTGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVK PGASVKVSKKASGYIFSNIYWI
 QWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVMTTRDTSTSTVYMELSS
 LRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 2).

Como se describe en detalle en los ejemplos de trabajo, el anticuerpo de cadena sencilla que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 es una variante del anticuerpo de cadena sencilla pexelizumab en el que la arginina (R) en la posición 38 se ha sustituido con una glutamina (Q). La sustitución R38Q confiere ventajas fisicoquímicas significativas al anticuerpo variante que incluye, por ejemplo, solubilidad aumentada en la solución acuosa. El anticuerpo variante contiene: una región variable de cadena ligera de anticuerpo (aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2); dos aminoácidos de una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina (aminoácidos 108 y 109); un ligado de péptido flexible (aminoácidos 110-124 de la SEQ ID NO: 2); y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2).

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 comprende una secuencia de aminoácidos que es mayor de por lo menos 50 (por ejemplo, mayor de o igual a 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99) % idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos contiene la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es mayor de por lo menos 50% idéntica a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido comprende un primer segmento de aminoácido que es idéntico a los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 y un segundo segmento que es idéntico a los aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí es un polipéptido variante que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2, pero con no más de 30 (por ejemplo, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1) sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras. Sin embargo, el polipéptido puede contener glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido no contiene sustituciones en los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 y/o sin sustituciones en los aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 comprende un fragmento de un polipéptido que tiene por lo menos 50% (ver anterior) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de un polipéptido variante descrito anteriormente. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 puede incluir por lo menos 20 (por ejemplo, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47, 50, 52, 55, 57, 60, 62, 65, 67, 70, 72, 75, 77, 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140,

145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, o 200 o más) aminoácidos consecutivos descrita en la SEQ ID NO: 2, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende por lo menos 20, pero menos de 246 (por ejemplo, 245, 244, 243, 242, 241, 240, 235, 230, 225, 220, 215, 210, 205, 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, o menos) aminoácidos consecutivos descritos en la SEQ ID NO: 2, en donde la secuencia de aminoácidos comprende la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2. Todo lo que se requiere del fragmento de polipéptido es que se una al componente de complemento C5.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 son variantes de eliminación, que retienen la glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2. Como se describió anteriormente, las variantes de eliminación pueden carecer de, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o 90 o más aminoácidos únicos. Las variantes de eliminación también pueden carecer de uno o más segmentos de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o 90 o más) aminoácidos consecutivos o aminoácidos únicos no contiguos. La eliminación puede ocurrir en el terminal carboxi y/o el terminal amino del polipéptido. En algunas realizaciones, la eliminación puede ser una eliminación interna. Por ejemplo, un polipéptido variante de eliminación unido a C5 puede comprender un primer segmento que comprende los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 (inclusive de glutamina 38) y un segundo segmento que comprende los aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2. Los dos segmentos de aminoácido se pueden ligar directamente o ligar por una secuencia de aminoácidos que es heteróloga al primer y segundo segmentos. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser una poliglicina o unidad estructural ligadora de poliserina descrita en, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 5,525,491 y 5,258,498, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende, o consiste de, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3).

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí puede ser una proteína de fusión. La proteína de fusión pueden comprender uno o más segmentos de unión a C5 (por ejemplo, segmentos de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2) y uno o más segmentos que son heterólogos al segmento de unión a C5. La secuencia heteróloga puede ser, por ejemplo, una etiqueta antigénica (por ejemplo, FLAG, polihistidina, hemaglutinina (HA), glutathione-S-transferasa (GST), o proteína de unión a maltosa (MBP)).

Las secuencias heterólogas también pueden ser proteínas útiles como marcadores diagnósticos o detectables, por ejemplo, luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), o acetil transferasa cloramfenicol (CAT). Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un primer segmento que comprende los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO: 2 (inclusive de glutamina 38) y un segundo segmento que comprende los aminoácidos 125-246 de la SEQ ID NO: 2, en donde el primer y segundo segmentos se conectan por una secuencia de aminoácidos heteróloga. En otro ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un segmento de unión a C5 que comprende los aminoácidos 1-246 de la SEQ ID NO: 2 y un segmento heterólogo de terminal amino y/o de terminal carboxi, por ejemplo, una etiqueta antigénica de terminal carboxi.

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 descrito aquí puede comprender (por ejemplo, como una proteína de fusión) o se une con (por ejemplo, se une químicamente a) una unidad estructural heteróloga que dirige los polipéptidos a un sitio de activación de complemento, por ejemplo, la superficie de los glóbulos rojos (por ejemplo, glóbulos rojos en un paciente PNH), el riñón (por ejemplo, un riñón trasplantado), una articulación (por ejemplo, una articulación de un paciente con artritis reumatoide), o el ojo (por ejemplo, la macula).

Los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se unen específicamente a una proteína de componente de complemento humano C5 (por ejemplo, la proteína C5 humana que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 4). Los términos "unión específica" o "se une específicamente" se refiere a dos moléculas que forman un complejo (por ejemplo, un complejo entre un polipéptido de unión a C5 y una proteína de componente de complemento C5) que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de asociación (k_a) es mayor que $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí tiene una constante de disociación (k_d) de menos de o igual a 10^{-3} (por ejemplo, 8×10^{-4} , 5×10^{-4} , 2×10^{-4} , 10^{-4} , o 10^{-5}) s^{-1} . En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí tiene un K_D de menos de 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , o 10^{-12} M. La constante de equilibrio K_D es la relación de las constantes de índice cinético $-k_d/k_a$. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí tiene un K_D de menos de 1×10^{-9} M (por ejemplo, menor de 1×10^{-10} M).

Los métodos para determinar si un polipéptido de unión a C5 se une a una proteína C5 y/o la afinidad del polipéptido de unión a C5 para una proteína C5 se conocen en la técnica. Por ejemplo, la interacción entre un polipéptido de unión a C5 y C5 se puede detectar y/o cuantificar utilizando una variedad de técnicas tal como, pero no limitado a, ensayos Western blot, dot blot, método de resonancia de superficie de plasmón (por ejemplo, Biacore system; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.), Octet, o ensayo inmunoabsorbente

ligado a enzima (ELISA). Véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols," Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide," W.H. Freeman y Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering," 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; John et al. (1993) J Immunol Meth 160: 191-198; Jonsson et al. (1993) Ann Biol Clin 51: 19-26; y Jonsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627. Véase también Patente Estadounidense No. 6,355,245.

Como se describió anteriormente, el polipéptido de unión a C5 actualmente descrito puede inhibir el componente de complemento C5. En particular, los polipéptidos inhiben la generación de la anafilotoxina C5a y/o fragmentos activos C5b de una proteína del componente complemento C5 (por ejemplo, una proteína humana C5). De acuerdo con lo anterior, los polipéptidos de unión a C5 inhiben, por ejemplo, los efectos pro-inflamatorios de C5a y la generación del complejo de ataque de membrana C5b-9 (MAC) en la superficie de una célula y lisis celular posterior. (Véase, por ejemplo, Moongkarndi et al. (1982) Immunobiol 162:397 y Moongkarndi et al. (1983) Immunobiol 165:323).

Los métodos adecuados para medir la inhibición de la división C5 se describen aquí y se conocen en la técnica. Por ejemplo, la concentración y/o actividad fisiológica de C5a y C5b en un fluido corporal se puede medir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos para medir la concentración C5a o actividad incluyen, por ejemplo, ensayos de quimiotaxis, RIA, o ELISA (véase, por ejemplo, Ward and Zvaifler (1971) J Clin Invest 50 (3): 606-16 y Wurznier et al. (1991) Complement Inflamm 8:328-340). Para el C5b, se pueden utilizar los ensayos hemolíticos o ensayos para el C5b-9 soluble como se discute aquí. También se pueden utilizar otros ensayos conocidos en la técnica.

La inhibición del componente de complemento C5 también reduce la capacidad de lisar la célula de complemento en los fluidos corporales de un sujeto. Dichas reducciones de la capacidad de lisar la célula del complemento presente se puede medir mediante métodos bien conocidos en la técnica tal como, por ejemplo, mediante un ensayo hemolítico convencional tal como el ensayo de hemólisis descrito por Kabat and Mayer (eds), "Experimental Immunochimistry, 2da Edición," 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de este ensayo tal como el método de hemólisis de eritrocito de pollo como se describe en, por ejemplo, Hillmen et al. (2004) N Engl J Med 350(6):552.

Los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden producir utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte de la biología molecular y la química

de proteína. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de unión a C5 descrito aquí (por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 que comprende o que consiste de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2) se puede insertar dentro de un vector de expresión que contiene las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales, que incluyen, por ejemplo, secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y parada transcripcionales, secuencias de inicio y parada traduccionales, señales terminadoras de transcripción, señales de poliadenilación, y secuencias mejoradoras o activadoras. Las secuencias reguladoras incluyen un promotor y las secuencias de inicio y parada transcripcionales. Adicionalmente, el vector de expresión puede incluir más de un sistema de replicación de tal manera que se puede mantener en dos organismos diferentes, por ejemplo en células de insecto o mamífero para la expresión y en un anfitrión procariótico para clonación y amplificación. Un ácido nucleico de ejemplo, que codifica un polipéptido de unión a C5 ejemplo, es como sigue:

```
GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGAT
AGGGTCACCATCACCTGCGGCGCCAGCGAAAACATCTATGGCGCGCTGAA
CTGGTATCAACAGAAACCCGGGAAAGCTCCGAAGCTTCTGATTTACGGTG
CGACGAACCTGGCAGATGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGGCTCCG
GAACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTCGCT
ACGTATTACTGTCAGAACGTTTTAAATACTCCGTTGACTTTCGGACAGGGT
ACCAAGGTGGAAATAAAACGTA CTGGCGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGTGG
ATCTGGTGGTGGCGGTTCTC AAGTCCA ACTGGTGCAATCCGGCGCCGAGG
TCAAGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAAGTGTCTGTAAAGCTAGCGGCTAT
ATTTTTTCTAATTATTGGATTCAATGGGTGCGTCAGGCCCGGGCAGGGC
CTGGAATGGATGGGTGAGATCTTACCGGGCTCTGGTAGCACCGAATATAC
CGAAAATTTTAAAGACCGTGTTACTATGACGCGTGACACTTCGACTAGTA
CAGTATACATGGAGCTCTCC AGCCTGCGATCGGAGGAC ACGGCCGTCTAT
TATTGCGCGCGTTATTTTTTTGGTTCTAGCCCGAATTGGTATTTTGATGTTT
GGGGTCAAGGAACCCTGGTCACTGTCTCGAGCTGA (SEQ ID NO: 1). En
algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende nucleótidos 1-738 de la SEQ
ID NO: 1, por ejemplo, en realizaciones en donde las proteínas de fusión de
terminal carboxi se generan o se producen.
```

Diversos sistemas de vector posibles están disponibles para la expresión de los polipéptidos de unión a C5 de ácidos nucleicos en células de mamífero. Una clase de vectores se basa en la integración de las secuencias de gen deseadas dentro del genoma de la célula anfitriona. Las células que tiene ADN establemente integrado se pueden seleccionar al introducir simultáneamente genes de resistencia a fármaco tal como E. coli gpt (Mulligan and Berg (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:2072) o Tn5 neo (Southern and Berg (1982) Mol Appl Genet 1: 327). El gen marcador seleccionable se puede ligar a las secuencias de gen de

ADN que se van a expresar, o introducir en la misma célula mediante co-transfección (Wigler et al. (1979) Cell 16:77). Una segunda clase de vectores utiliza elementos de ADN que confieren capacidades de replicación automática en un plásmido extracromosómico. Estos vectores se pueden derivar de virus animales, tal como virus papiloma de bobino (Sarver et al. (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79:7147), virus polioma (Deans et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:1292), o virus SV40 (Lusky and Botchan (1981) Nature 293:79).

Los vectores de expresión se pueden introducir en células en una forma adecuada para la expresión posterior del ácido nucleico. El método de introducción se dicta grandemente por el tipo de célula objetivo, discutido adelante. Los métodos de ejemplo incluyen precipitación de CaPO_4 , fusión de liposoma, lipofectina, electroporación, infección vírica, transfección mediada por dextrano, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, y microinyección directa.

Las células anfitrionas apropiadas para la expresión del polipéptido de unión a C5 incluyen células de levadura, de bacterias, insecto, planta, y células de mamífero. Son de interés particular bacterias tal como *E. coli*, hongos tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insecto tal como SF9, estirpes celulares de mamífero (por ejemplo, estirpes celulares humanas), así como también estirpes celulares primarias (por ejemplo, células de mamífero primarias). En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 se pueden expresar en células de ovario de hámster Chino (CHO) o en una estirpe celular de mieloma adecuada tal como (NSO).

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede expresar en, y se purifica de, animales transgénicos (por ejemplo, mamíferos transgénicos). Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 se puede producir en mamíferos diferente a humanos transgénicos (por ejemplo, roedores, ovejas o cabras) y se aísla de leche como se describe en, por ejemplo, Houdebine (2002) Curr Opin Biotechnol 13 (6): 625-629; van Kuik-Romeijn et al. (2000) Transgenic Res 9 (2): 155-159; y Pollock et al. (1999) J Immunol Methods 231(1-2): 147-157.

Los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden producir a partir de células al cultivar una célula anfitriona transformada con el vector de expresión que contiene el ácido nucleico que codifica los anticuerpos, bajo condiciones, y durante una cantidad de tiempo, suficiente para permitir la expresión de las proteínas. Dichas condiciones para la expresión de la proteína variarán con la elección del vector de expresión y la célula anfitriona, y será fácilmente determinado por un experto en la técnica a través de experimentación de rutina. Por ejemplo, los polipéptidos expresados en *E. coli* se pueden replegar de cuerpos de inclusión (véase, por ejemplo, Hou et al. (1998) Cytokine 10:319-30). Los

sistemas y métodos de expresión bacteriana para su uso se conocen bien en la técnica (véase *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, y *Molecular Cloning-A Laboratory Manual-3rd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). La elección de los codones, los vectores de expresión adecuados y las células anfitrionas adecuadas variarán dependiendo de un número factores, y se pueden optimizar fácilmente según se necesite. Un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede expresar en células de mamífero o en otros sistemas de expresión que incluyen pero no se limitan a levadura, baculovirus, y sistemas de expresión in vitro (véase, por ejemplo, Kaszubska et al. (2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220).

Luego de expresión, se puede aislar el polipéptido de unión a C5. El término "purificado" o "aislado" cuando se aplica a cualquiera de las proteínas descritas aquí (por ejemplo, un polipéptido de unión a C5) se refiere a un polipéptido que se ha separado o purificado de los componentes (por ejemplo, proteínas u otras moléculas orgánicas o biológicas que ocurren en forma natural) que los acompaña, por ejemplo, otras proteínas, lípidos, y ácido nucleico en un procariote que expresa las proteínas. Normalmente, un polipéptido se purifica cuando constituye por lo menos 60 (por ejemplo, por lo menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97, o 99) %, en peso, de la proteína total en una muestra.

Un polipéptido de unión a C5 se puede aislar o purificar en una variedad de formas conocidas para aquellos expertos en la técnica dependiendo de lo que otros componentes están presentes en la muestra. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas, y cromatográficas, que incluyen cromatografía de intercambio de ión, hidrófoba, de afinidad, y HPLC de fase inversa. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 se puede purificar utilizando una columna de anticuerpo estándar o, por ejemplo, una columna de proteína-A o proteína-G. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, en conjunto con concentración de proteína, también son útiles. Véase, por ejemplo, Scopes (1994) "Protein Purification, 3ra edición," Springer- Verlag, New York City, New York. El grado de purificación necesario variará dependiendo del uso deseado. En algunos casos, no será necesaria la purificación del polipéptido expresado del mismo.

Los métodos para determinar el rendimiento o pureza de un polipéptido purificado se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayo Bradford, espectroscopía UV, ensayo de proteína Biuret, ensayo de proteína Lowry, ensayo de proteína de negro amido, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masa (MS), y métodos electroforéticos de gel (por ejemplo, utilizando un tñido de proteína tal como Azul Coomassie o tñido plata coloidal).

En algunas realizaciones, la endotoxina se puede retirar las preparaciones de polipéptido de unión a C5. Los métodos para retirar la endotoxina de una muestra de proteína se conocen en la técnica. Por ejemplo, la endotoxina se puede retirar de una muestra de proteína utilizando una variedad de reactivos comercialmente disponibles que incluyen, sin limitación, los Equipos de Retiro de Endotoxina ProteoSpin™ (Norgen Biotek Corporation), Gel de Retiro de Endotoxina de Gel Detoxi (Thermo Scientific; Pierce Protein Research Products), Equipo de Retiro de Endotoxina MiraCLEAN® (Minis), o membrana Acrodisc™ - Mustang® E (Pall Corporation).

Los métodos para detectar y/o medir la cantidad de endotoxina presente en una muestra (antes y después de purificación) se conocen en la técnica y están disponibles equipos comerciales. Por ejemplo, la concentración de endotoxina en una muestra de proteína se puede determinar utilizando el equipo Cromogénico QCL-1000 (BioWhittaker), equipos basados en lisado amebocito limulus (LAL) tal como los equipos Pyrotell®, Pyrotell®-T, Pyrochrome®, Chromo-LAL, y CSE disponibles de the Associates of Cape Cod Incorporated.

Conjugados y Proteínas de fusión

Los polipéptidos de unión a C5 se pueden modificar siguiendo su expresión y purificación. Las modificaciones pueden ser modificaciones covalentes o no covalentes. Dichas modificaciones se pueden introducir en los polipéptidos de unión a C5 al, por ejemplo, hacer reaccionar los residuos de aminoácido objetivo del polipéptido con un agente derivado orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los sitios adecuados para modificación se pueden seleccionar utilizando cualquiera de una variedad de criterios que incluyen, por ejemplo, análisis estructural o análisis de secuencia de aminoácido de los polipéptidos de unión a C5.

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 se puede conjugar a una unidad estructural heteróloga. En realizaciones en donde la unidad estructural heteróloga es un polipéptido, un polipéptido de unión a C5 y unidad estructural heteróloga descrito aquí se puede unir por medio de la proteína de fusión. La unidad estructural heteróloga puede ser, por ejemplo, un polipéptido heterólogo, un agente terapéutico (por ejemplo, una toxina o un fármaco), o una etiqueta detectable tal como, pero no limitado a, una etiqueta radioactiva, una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, o una etiqueta luminiscente. Los polipéptidos heterólogos adecuados incluyen, por ejemplo, una etiqueta antigénica (por ejemplo, FLAG, polihistidina, hemaglutinina (HA), glutathione- S-transferasa (GST), o proteína de unión a maltosa (MBP)) para uso en purificar los anticuerpos. Los polipéptidos heterólogos también incluyen polipéptidos que son útiles como marcadores diagnósticos o detectables, por ejemplo, luciferasa, proteína

fluorescente verde (GFP), o acetil transferasa cloramfenicol (CAT). Cuando la unidad estructural heteróloga es un polipéptido, la unidad estructural se puede incorporar en un polipéptido de unión a C5, que resulta en una proteína de fusión. Los polipéptidos heterólogos también incluyen, por ejemplo, factores de crecimiento, citoquinas, y quimioquinas. Los factores de crecimiento pueden incluir, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), proteína morfogénica ósea (BMP), factor estimulante de colonia de granulocito (G-CSF), factor estimulante de colonia de macrófago de granulocito (GM-CSF), factor de crecimiento de nervio (NGF); una neurotrofina, factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), miostatina (GDF-8), factor-9 de diferenciación de crecimiento (GDF9), factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF o FGF2), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocito (HGF), y una neuregulina (por ejemplo, NRG1, NRG2, NRG3, o NRG4). Las citoquinas incluyen, por ejemplo, interferones (por ejemplo, IFNy), factor de necrosis de tumor (por ejemplo, TNFa o TNF), y las interleuquinas (por ejemplo, IL-1 a IL-33 (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, o IL-15)). Las quimioquinas incluyen, por ejemplo, 1-309, TCA-3, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CIO, MRP-2, MARC, MCP-3, MCP-2, MRP-2, CCF18, Eotaxina, MCP-5, MCP-4, NCC-1, HCC-1, leucotactina-1, LEC, NCC-4, TARC, PARC, o Eotaxina-2. En algunas realizaciones, la unidad estructural heteróloga es una unidad estructural objetivo.

La descripción también caracteriza una construcción que comprende un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y una unidad estructural objetivo que dirige el polipéptido de unión a C5 a una célula, tejido, o microambiente biológico de interés. Por ejemplo, una construcción puede contener un polipéptido de unión a C5 y una unidad estructural objetivo que dirige el polipéptido a un sitio de activación de complemento (por ejemplo, glóbulos rojos de pacientes con enfermedad hemolítica tal como PNH, CAD, aHUS, o TTP). El sitio de activación de complemento también puede ser, por ejemplo, la vasculatura de un órgano trasplantado, el ojo de un paciente con AMD, los pulmones de un paciente con asma o COPD, o una articulación de un paciente afligido con RA. Dichas unidades estructurales objetivo pueden incluir, por ejemplo, la forma soluble del receptor de complemento 1 (CR1), una forma soluble del receptor de complemento 2 (CR2), o un anticuerpo (o fragmento de unión antígeno del mismo) que se une a C3b y/o C3d.

Los métodos para generar proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen un polipéptido de unión a C5 y una forma soluble de CR1 humano o CR2 humano) se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente Estadounidense no. 6,897,290; publicación de solicitud de Patente Estadounidense no. 2005265995; y Song et al. (2003) J Clin Invest 1102: 1875-

1885. Los métodos para producir un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que comprende un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y un anticuerpo que se une a C3b y/o C3d) también se conocen en la técnica y se describen aquí.

5

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 puede contener una unidad estructural que dirige el polipéptido al riñón. Dichas construcciones pueden ser útiles, por ejemplo, para tratar enfermedades asociadas con complemento del riñón tal como, pero no limitado a, lesión renal de isquemia-reperfusión (IRI), rechazo de trasplante renal, o síndrome urémico hemolítico. Los antígenos a los que el riñón dirige la unidad estructural pueden incluir, por ejemplo, dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), Lrp2 (megalina), Cubn (cubilina), Abcc2 (casete de unión ATP, sub-familia C, miembro 2), Abcc4 (Casete de unión ATP, sub-familia C, miembro 4), Abcb1b (casete de unión ATP, sub-familia B, miembro 1; P-glicoproteína), Slc1a1 (portador de aminoácido excitatorio 1), Slc3a1 (cistina, transportadores de aminoácido neutros y dibásicos), Slc5a1 (cotransportador de sodio/glucosa 1), Slc5a2 (cotransportador de sodio/glucosa 2), Slc9a3 (intercambiador de sodio/hidrógeno 3), Slc10a2 (polipéptido cotransportador de sodio/taurocolato), Slc13a2 (cotransportador de dicarboxilato dependiendo de sodio), Slc15a1 (transportador de oligopéptido 1), Slc15a2 (transportador de oligopéptido 2), Slc17a1 (transportador de fosfato de sodio 1), Slc17a2 (transportador de fosfato de sodio 3), Slc17a3 (transportador de fosfato de sodio 4), Slc1a1 (proteína transportadora de anión orgánico 1), Slc22a4 (transportador de catión orgánico OCTN1), Slc22a5 (transportador de catión orgánico OCTN2), Slc22a1 1 (transportador de anión orgánico 4), Slc34a1 (transportador de fosfato de sodio IIa), megalina (proteína 2 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad, LRP2), endopeptidasa neutra (NEP), CD 10, mucina 20 (u otras mucinas), molécula 1 de lesión de riñón (KIM-1), o receptor celular 1 de virus de hepatitis A y megalina.

30

Se conoce una amplia variedad de formatos de anticuerpo biespecíficos de ingeniería de anticuerpo y métodos para elaborar los anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que comprende un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y un anticuerpo que se une a C3b, C3d, o un antígeno específico de tejido) están bien dentro del ámbito de aquellos expertos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello (1983) Nature 305:537-539). Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión puede incluir un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, por lo menos parte

40

de las regiones de articulación, CH2, y CH3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo anfitrión adecuado. Para detalles adicionales de métodos actualmente conocidos ilustrativos para generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology* 121:210; Publicación PCT No. WO 96/27011; Brennan et al. (1985) *Science* 229:81; Shalaby et al, *J. Exp. Med.* (1992) 175:217-225; Kostelny et al. (1992) *J Immunol* 148(5): 1547-1553; Hollinger et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448; Gruber et al. (1994) *J Immunol* 152:5368; y Tutt et al. (1991) *J Immunol* 147:60. Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos heteroconjugados o entrecruzados. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer utilizando cualesquiera métodos de entrecruzamiento convenientes. Los agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica, y se describen en la Patente Estadounidense No. 4,676,980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

La Patente Estadounidense No. 5,534,254 describe diversos tipos diferentes de anticuerpos biespecíficos que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv de cadena sencilla ligados por acopladores de péptido, agentes quelantes, o acoplamientos químicos o de disulfuro. En otro ejemplo, Segal and Bast [(1995) *Curr Protocols Immunol Suppl.* 14:2.13.1-2.13.16] describe métodos para entrecruzar químicamente dos anticuerpos monoespecíficos para formar así un anticuerpo biespecífico. Como se describió anteriormente, un anticuerpo biespecífico descrito aquí se puede formar, por ejemplo, al conjugar dos anticuerpos de cadena sencilla que se seleccionan de, por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y un anticuerpo que se une a, por ejemplo, C3b, C3d, o un antígeno específico de pulmón, un antígeno específico de ojo, o un antígeno específico de riñón.

Diversas técnicas para elaborar y aislar los fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo celular recombinante también se han descrito. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. (Véase, por ejemplo, Kostelny et al. (1992) *J Immunol* 148(5): 1547-1553 y de Kruif and Logtenberg (1996) *J Biol Chem* 271(13):7630-7634). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se pueden ligar a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo se pueden reducir en la región de articulación para formar monómeros y luego volverlos a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico puede ser un fragmento Fv de cadena sencilla tándem (sc), que contiene dos fragmentos scFv diferentes

atar covalentemente mediante un ligador (por ejemplo, un ligador de polipéptido). Véase, por ejemplo, Ren-Heidenreich et al. (2004) *Cancer* 100:1095-1103 y Korn et al. (2004) *J Gene Med* 6:642-651. Ejemplos de ligadores pueden incluir pero no se limitan a $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (G4S), $(\text{Gly}_3\text{Ser})_4$ (G3S), SerGly_4 , y $\text{SerGly}_4\text{SerGly}_4$. En algunas realizaciones, el ligador puede contener, o tener, todo o parte de una región constante de polipéptido de cadena pesada tal como un dominio CHI como se describe en, por ejemplo, Grosse-Hovest et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6858-6863. En algunas realizaciones, los dos fragmentos de anticuerpo se pueden atar covalentemente por medio de un ligador de poliglicina-serina o poliserina-glicina como se describe en, por ejemplo, la Patente Estadounidense nos. 7,112,324 y 5,525,491, respectivamente. Véase también Patente Estadounidense no. 5,258,498, la descripción con respecto a la ingeniería de anticuerpo y los ligadores se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los métodos para generar los anticuerpos scFv tándem biespecíficos se describen en, por ejemplo, Maletz et al. (2001) *Int J Cancer* 93:409-416; Hayden et al. (1994) *Ther Immunol* 1:3-15; y Honemann et al. (2004) *Leukemia* 18:636-644. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en, por ejemplo, Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1057- 1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos tándem Fd (V_H - $\text{C}_\text{H}1$ - V_H - $\text{C}_\text{H}1$) que forman un par de regiones de unión de antígeno.

Un anticuerpo biespecífico también puede ser un diacuerpo. La tecnología de diacuerpo descrita mediante, por ejemplo, Hollinger et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un ligador que es muy corto para permitir la formación de pares entre los dos dominios en la misma cadena. De acuerdo con lo anterior, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a formación de pares con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando por lo tanto dos sitios de unión a antígeno. (Véase también, por ejemplo, Zhu et al. (1996) *Biotechnology* 14: 192-196 y Helfrich et al. (1998) *Int J Cancer* 76:232-239). Los diacuerpos de cadena sencilla biespecíficos (scDb) así como también métodos para generar scDb se describen en, por ejemplo, Brusselbach et al. (1999) *Tumor Targeting* 4: 115-123; Kipriyanov et al. (1999) *JMol Biol* 293:41-56; y Nettlebeck et al. (2001) *Mol Ther* 3:882-891.

La descripción también abarca formas variantes de anticuerpos biespecíficos tal como las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable dual tetravalente (DVD-Ig) descritas en Wu et al. (2007) *Nat Biotechnol* 25(11): 1290-1297. Las moléculas DVD-Ig se designan de tal manera que dos dominios variables de cadena ligera diferentes (V_L) de dos anticuerpos progenitores diferentes se ligan en tándem directamente o por medio de un ligador corto

mediante técnicas de ADN recombinantes, seguido por el dominio constante de cadena ligera. Los métodos para generar las moléculas DVD-Ig de dos anticuerpos progenitores se describen adicionalmente en, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO 08/024188 y WO 07/024715, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. También se abarca el formato biespecífico descrito en, por ejemplo, la publicación de solicitud de Patente Estadounidense no. 20070004909, cuya descripción se incorpora como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos anti-C3b de ejemplo así como también métodos adecuados para producir dichos anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, publicación PCT no. WO 87/06344; Patente Estadounidense no. 6,572,856; Peng et al. (2004) J Clin Oncol 22(14S):2621; y Peng et al. (2005) Cancer Immunol Immunother 54(12): 1172-9, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos anti-C3d de ejemplo así como también métodos adecuados para producir dichos anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Cruz and Leon (2007) Hybridoma 26(6):433-4; Koistinen et al. (1989) Complement Inflamm 6(4):270-280; y Dobbie et al. (1987) Transfusion 27(6):453-459, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Los polipéptidos de unión a C5 y las unidades estructurales objetivo que se utilizan para formar las moléculas de anticuerpo descritas aquí pueden ser, por ejemplo, quiméricos, humanizados, rehumanizados, desimmunizados, o completamente humanos. Los anticuerpos quiméricos se producen mediante procesos recombinantes bien conocidos en la técnica de ingeniería de anticuerpo y tienen una región variable de mamífero no humano y una región constante humana. Los anticuerpos humanizados corresponden más cercanamente a la secuencia de anticuerpos humanos que hacen anticuerpos quiméricos. Los dominios variables humanizados se construyen en los que las secuencias de aminoácidos de uno o más CDR de origen no humano se injertan a las regiones de estructura principal humana (FR) como se describe en, por ejemplo, Jones et al. (1996) Nature 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327 y Patente Estadounidense No. 5,530,101. El anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo que contiene una o más regiones de estructura principal humana que no son líneas germinales. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede contener una o más regiones de estructura principal que se someten a hipermutación somática y así no son más germinales per se. (Véase, por ejemplo, Abbas, Lichtman, y Pober (2000) "Cellular and Molecular Immunology," 4ta Edición, W.B. Saunders Company (ISBN:0721682332)). En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado contiene regiones de estructura principal de línea germinal humana, por ejemplo, regiones VH de línea germinal humana, regiones D de línea germinal humana, y regiones J de línea germinal humana (por ejemplo, regiones J_H de línea germinal humana). El Centro MRC para la Ingeniería de Proteína mantiene el

sistema de base de datos en línea VBase, que incluye las secuencias de aminoácidos para un gran número de regiones de estructura principal de línea germinal humana. Véase, por ejemplo, Welschhof et al. (1995) *J Immunol Methods* 179:203-214; Chothia et al. (1992) *JMol Biol* 227:776-798; Williams et al. (1996) *JMol Biol* 264:220-232; Marks et al. (1991) *Eur J Immunol* 21: 985-991; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. Las secuencias de aminoácidos para un repertorio de regiones de estructura principal de línea germinal humana adecuadas también se pueden obtener de la Base de Datos Germline JOINSOLVER® (por ejemplo, la base de datos Kabat JOINSOLVER® o la base de datos IMGT JOINSOLVER®) mantenida en parte por el Departamento de Saludo y Servicios Humanos y los Institutos Nacionales de Salud. Véase, por ejemplo, Souto-Carneiro et al. (2004) *J Immunol.* 172:6790-6802.

Los anticuerpos completamente humanos son anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagenia específica de sitio o aleatoria in vitro o mediante mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en las secuencias de estructura principal humanas (es decir, anticuerpos humanizados). Los anticuerpos humanos o completamente humanos se pueden derivar de ratones transgénicos que llevan los genes de anticuerpo humanos (que llevan exones variables (V), diversidad (D), unión (J), y constante (C)) o de células humanas. Por ejemplo, es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, luego de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. (Véase, por ejemplo, Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258; Bruggemann et al. (1993) *Year in Immunol.* 7:33; y Duchosal et al. (1992) *Nature* 355:258). Las cepas de ratón transgénico se pueden construir por ingeniería por contener las secuencias de gen de genes de inmunoglobulina humana no reordenados. Las secuencias humanas pueden codificar las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos y funcionaría correctamente en los ratones, que experimentan redistribución para proporcionar un repertorio de anticuerpo amplio similar a aquel en humanos.

Los anticuerpos completamente y parcialmente humanos descritos anteriormente son menos inmunogénicos que sus contrapartes de anticuerpo completamente derivadas de murino o no humano. Todas estas moléculas (o derivados de los mismos) por lo tanto probablemente menos evocan una respuesta inmune o alérgica. Posteriormente, estos son más adecuados para

administración in vivo en humanos, especialmente cuando se repiten o administración a largo plazo si es necesario, se puede necesitar para tratamiento con los anticuerpos biespecíficos descritos aquí (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que comprenden un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y una
5 unidad estructural objetivo).

Las etiquetas radioactivas adecuadas incluyen, por ejemplo, ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , y ^3H . Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, sin limitación, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína fluorescente verde
10 (GFP), DyLight 488, ficoeritrina (PE), yoduro de propidio (PI), PerCP, PE-Alexa Fluor® 700, Cy5, alofococianina, y Cy7. Las etiquetas luminiscentes incluyen, por ejemplo, cualquiera de una variedad de quelados de lantánido luminiscente (por ejemplo, europio o terbio). Por ejemplo, los quelados de europio adecuados incluyen el quelado de europio de ácido dietileno triamina pentaacético (DTP A) o
15 ácido tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). Las marcas enzimáticas incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina, CAT, luciferasa, y peroxidasa de rábano.

Se pueden entrecruzar dos proteínas (por ejemplo, un polipéptido de unión
20 a C5 y una unidad estructural heteróloga) utilizando cualquiera de una serie de entrecruzadores químicos conocidos. Ejemplos de dichos entrecruzadores son aquellos que ligan dos residuos de aminoácido por medio de un enlace que incluye un enlace de disulfuro "obstaculizado". En estos enlaces, un enlace de disulfuro dentro de la unidad de entrecruzamiento se protege (mediante grupos
25 obstaculizados en el lado del enlace de disulfuro) de la reducción mediante la acción, por ejemplo, de glutatona reducida o la reductasa de disulfuro de enzima. Un reactivo adecuado, 4-succinimidiloxycarbonil-a-metil-a (2-piridilditio) tolueno (SMPT), forma dicho enlace entre dos proteínas que utilizan una lisina terminal en una de las proteínas y una cisteína de terminal en el otro. Los reactivos
30 heterobifuncionales que se entrecruzan por una unidad estructural de acoplamiento diferente en cada proteína también se pueden utilizar. Otros entrecruzadores útiles incluyen, sin limitación, reactivos que unen dos grupos amino (por ejemplo, N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimida), dos grupos sulfhidrilo (por ejemplo, 1,4-bis-maleimidobutano), un grupo amino y un grupo sulfhidrilo (por
35 ejemplo, éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxysuccinimida), un grupo amino y un grupo carboxilo (por ejemplo, 4-[p-azidosalicilamido]butilamina), y un grupo amino y un grupo guanidinio que está presente en la cadena lateral de arginina (por ejemplo, monohidrato de p-azidofenil glioxal).

40 En algunas realizaciones, una etiqueta radioactiva se puede conjugar directamente con la estructura principal de aminoácido del polipéptido de unión a C5. Alternativamente, la etiqueta radioactiva se puede incluir como parte de una molécula mayor (por ejemplo, ^{125}I en meta-[^{125}I]yodofenil-N-hidroxysuccinimida

([¹²⁵I]m/PNHS) que se une a los grupos amino libres para formar derivados meta-yodofenilo (m/P) de las proteínas relevantes (véase, por ejemplo, Rogers et al. (1997) J Nucl Med 38: 1221-1229) o quelado (por ejemplo, DOTA o DTPA) que a su vez se une a la estructura principal de la proteína. Los métodos para conjugar las etiquetas radioactivas o moléculas /quelados grandes que los contienen al polipéptido de unión a C5 descrito aquí se conocen en la técnica. Dichos métodos implican incubar las proteínas con la etiqueta radioactiva bajo condiciones (por ejemplo, pH, concentración de sal, y/o temperatura) que facilita la unión de la marca radioactiva o quelado para la proteína (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,001,329).

Los métodos para conjugar una etiqueta fluorescente (algunas veces denominado como un "fluoróforo") en una proteína (por ejemplo, un polipéptido de unión a C5) se conocen en la técnica de la química de proteína. Por ejemplo, los fluoróforos se pueden conjugar en grupos amino libres (por ejemplo, de lisinas) o grupos sulfhidrilo (por ejemplo, cisteínas) de proteínas utilizando unidades estructurales de éster succinimidilo (NHS) o éster tetrafluorofenilo (TFP) unidas a los fluoróforos. En algunas realizaciones, los fluoróforos se pueden conjugar en una unidad estructural entrecruzada heterobifuncional tal como sulfo-SMCC. Los métodos de conjugación adecuados implican incubar un polipéptido de unión a C5 con el fluoróforo bajo condiciones que facilitan la unión del fluoróforo a la proteína. Véase, por ejemplo, Welch and Redvanly (2003) "Handbook of Radiopharmaceuticals: Radio chemistry and Applications," John Wiley and Sons (ISBN 0471495603).

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 se pueden modificar, por ejemplo, con una unidad estructural que mejora la estabilización y/o retención de los anticuerpos en circulación, por ejemplo, en sangre, suero, u otros tejidos. Por ejemplo, el polipéptido de unión a C5 se puede PEGilar como se describe en, por ejemplo, Lee et al. (1999) Bioconjug Chem 10(6): 973-8; Kinstler et al. (2002) Advanced Drug Deliveries Reviews 54:477-485; y Roberts et al. (2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54:459-476. La unidad estructural de estabilización puede mejorar la estabilidad, o retención de, el polipéptido mediante por lo menos 1.5 (por ejemplo, por lo menos 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, o 50 o más) veces.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden glucosilar. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede someter a tratamiento enzimático o químico, o producir a partir de una célula, de tal manera que el anticuerpo ha reducido o está ausente de glucosilación. Los métodos para producir polipéptidos con glucosilación reducida se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente

Estadounidense no. 6,933,368; Wright et al. (1991) EMBO J 10 (10): 2717-2723 ; y Co et al. (1993) Mol Immunol 30: 1361.

Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas

5

Las composiciones que contienen un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se pueden formular como una composición farmacéutica, por ejemplo, para administración a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno asociado con complemento. La composición farmacéutica incluirá de manera general un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a, e incluye, cualquiera y todos los solventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso isotónicos y de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Las composiciones pueden incluir una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de adición ácida o una sal de adición base (véase por ejemplo, Berge et al. (1977) J Pharm Sci 66: 1-19).

Las composiciones se pueden formular de acuerdo con métodos estándar. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe adicionalmente en, por ejemplo, Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems," 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); y Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association," 3rd Edition (ISBN: 091733096X). En algunas realizaciones, una composición se puede formular, por ejemplo, como una solución reguladora en una concentración adecuada y adecuada para almacenamiento a 2-8° C (por ejemplo, 4° C). En algunas realizaciones, una composición se puede formular para almacenamiento a una temperatura por debajo de 0°C (por ejemplo, -20°C o -80°C). En algunas realizaciones, la composición se puede formular para almacenamiento durante hasta 2 años (por ejemplo, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 1½ años, o 2 años) a 2-8°C (por ejemplo, 4°C). Sin embargo, en algunas realizaciones, las composiciones descritas aquí son estables en almacenamiento durante por lo menos 1 año a 2-8°C (por ejemplo, 4°C).

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas. Estas formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tal como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende, en parte, del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Por ejemplo, las composiciones que

contienen un polipéptido de unión a C5 destinados para suministro sistémico o local pueden estar en la forma de soluciones inyectables o infusibles. De acuerdo con lo anterior, las composiciones se pueden formular para administración mediante un modo parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular). "Administración parenteral," "administrado parenteralmente," y otras frases gramaticalmente equivalentes, como se utiliza aquí, se refiere a modos de administración diferentes a administración entérica y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural, intracerebral, intracranial, intracarótida y intrasternal (véase adelante).

Las composiciones se pueden formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para el almacenamiento estable a alta concentración. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar un polipéptido de unión a C5 descrito aquí en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. De manera general, las dispersiones se preparan al incorporar un polipéptido de unión a C5 descrito aquí en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos para preparación incluyen secado por vacío y secado por congelamiento que producen un polvo de un polipéptido de unión a C5 descrito aquí más cualquier ingrediente deseado adicional (véase adelante) de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede poner aproximadamente al incluir en la composición un reactivo que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato, y gelatina.

Los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí también se pueden formular en composiciones de inmunoliposoma. Las liposomas que contienen el anticuerpo se pueden preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica tal como, por ejemplo, los métodos descritos en Epstein et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:3688; Hwang et al. (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:4030; y Patente Estadounidense Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Las liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,013,556.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, J.R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems," Marcel Dekker, Inc., New York.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede formular en una composición adecuada para administración intrapulmonar (por ejemplo, para administración por medio de un inhalador o nebulizador) a un mamífero tal como un humano. Los métodos para preparar dichas composiciones se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20080202513; Patente Estadounidense Nos. 7,112,341 y 6,019,968; y Publicación PCT Nos. WO 00/061178 y WO 06/122257, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las formulaciones de inhalador en polvo seco y los sistemas adecuados para administración de las formulaciones se describen en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20070235029, Publicación PCT No. WO 00/69887; y Patente Estadounidense No. 5,997,848. Las formulaciones adicionales adecuadas para administración intrapulmonar (así como también métodos para formular polipéptidos) se establecen en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Nos. 20050271660 y 20090110679.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede formular en una composición adecuada para suministro al ojo. Como se utiliza aquí, el término "ojo" se refiere a cualquiera y todos los tejidos anatómicos y estructuras asociadas con un ojo. El ojo tiene una pared compuesta de tres capas distintas: la externa esclerótica, la media corioide, y la interna retina. La cámara detrás de los lentes se llena con un fluido gelatinoso como el humor vítreo. Al respaldo del ojo está la retina, que detecta la luz. La cornea es un tejido ópticamente transparente, que transporta imágenes al respaldo del ojo. La cornea incluye una ruta para la permeación de los fármacos dentro del ojo. Otras estructuras de tejido anatómico asociadas con el ojo incluyen el sistema de drenaje lacrimal, que incluye un sistema secretor, un sistema distributivo y un sistema excretor. El sistema secretor comprende secretores que se estimulan por parpadeo y cambio de temperatura debido a evaporación de las lágrimas y reflejar secretores que tienen un suministro de nervio parasimpático eferente y secretar lágrimas en respuesta al estímulo físico o emocional. El sistema distributivo

incluye los párpados y los meniscos lacrimales alrededor de los bordes de los párpados de un ojo abierto, que esparce lágrimas sobre la superficie ocular por parpadeo, reduciendo así el desarrollo de áreas secas.

En algunas realizaciones, uno o más de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden administrar localmente, por ejemplo, por medio de aplicación tópica o inyección intravítrea. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 se pueden formular para administración por medio de una gota ocular.

La preparación terapéutica para tratar el ojo puede contener uno o más polipéptidos de unión a C5 en una concentración de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5% en una solución farmacéuticamente aceptable, suspensión o ungüento. La preparación preferiblemente estará en la forma de una solución acuosa estéril que contiene, por ejemplo, ingredientes adicionales tal como, pero no limitado a, conservantes, reguladores, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes clarificantes o humectantes no iónicos, y agentes que aumentan la viscosidad.

Los conservantes adecuados para uso en dicha solución incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, timerosal y similares. Los reguladores adecuados incluyen, por ejemplo, ácido bórico, bicarbonato de sodio y potasio, boratos de sodio y potasio, carbonato de sodio y potasio, acetato de sodio, y bifosfato de sodio, en cantidades suficientes para mantener el pH entre aproximadamente pH 6 y pH 8, y preferiblemente, entre aproximadamente pH 7 y pH 7.5. Los agentes de tonicidad adecuados son dextrano 40, dextrano 70, dextrosa, glicerina, cloruro de potasio, propilenglicol, y cloruro de sodio.

Los antioxidantes y estabilizantes adecuados incluyen bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, y tiourea. Los agentes clarificantes y humectantes adecuados incluyen polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 282 y tiloxapol. Los agentes que aumentan la viscosidad adecuados incluyen dextrano 40, dextrano 70, gelatina, glicerina, hidroxietilcelulosa, hidroximetilpropilcelulosa, lanolina, metilcelulosa, petrolato, polietilenglicol, alcohol polivinílico, povidona, y carboximetilcelulosa. La preparación se puede administrar tópicamente al ojo del sujeto en necesidad de tratamiento (por ejemplo, un sujeto afligido con AMD) mediante métodos convencionales, por ejemplo, en la forma de gotas, o al enjuagar el ojo en una solución terapéutica, que contiene uno o más polipéptidos de unión a C5.

Adicionalmente, se ha desarrollado una variedad de dispositivos para introducir fármacos en la cavidad vítrea del ojo. Por ejemplo, la Publicación de

Solicitud de Patente Estadounidense no. 20020026176 describe una almohadilla que contiene el producto farmacéutico que se puede insertar a través de la esclera de tal manera que protege en la cavidad vítrea para suministrar el agente farmacéutico en la cavidad vítrea. En otro ejemplo, la Patente Estadounidense no. 5,443,505 describe un dispositivo implantable para la introducción en el espacio supracoroidal o una región avascular para la liberación sostenida del fármaco en el interior del ojo. La Patente Estadounidense nos. 5,773, 019 y 6,001,386 cada uno describe un dispositivo de suministro de fármaco implantable que se puede unir a la superficie esclerótica de un ojo. El dispositivo comprende un núcleo interno que contiene una cantidad efectiva de un agente de baja solubilidad cubierto por un polímero no bioerosionable que es permeable al agente de baja solubilidad. Durante la operación, el agente de baja solubilidad permea el polímero bioerosionable cubierto por la liberación sostenida del dispositivo. Los métodos y dispositivos adicionales (por ejemplo, un parche trans-esclerótico y suministro por medio de lentes de contacto) para el suministro de un agente terapéutico al ojo se describen en, por ejemplo, Ambati and Adamis (2002) Prog Retin Eye Res 21(2): 145-151; Ranta and Urtti (2006) Adv Drug Delivery Rev 58(11): 1164- 1181 ; Barocas and Balachandran (2008) Expert Opin Drug Delivery 5(1): 1 - 10(10); Gulsen and Chauhan (2004) Invest Ophthalmol Vis Sci 45 :2342-2347; Kim et al. (2007) Ophthalmic Res 39:244-254; y Publicación PCT no. WO 04/073551, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Como se describió anteriormente, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden formular como concentraciones relativamente altas en soluciones farmacéuticas acuosas. Por ejemplo, los polipéptidos de unión a C5 se pueden formular en la solución en una concentración de entre aproximadamente 10 mg/mL a 100 mg/mL (por ejemplo, entre aproximadamente 9 mg/mL y 90 mg/mL; entre aproximadamente 9 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 10 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 110 mg/mL; entre aproximadamente 15 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 80 mg/mL; entre aproximadamente 25 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 25 mg/mL y 85 mg/mL; entre aproximadamente 20 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 25 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 30 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 30 mg/mL y 50 mg/mL; entre aproximadamente 40 mg/mL y 100 mg/mL; entre aproximadamente 50 mg/mL y 100 mg/mL; o entre aproximadamente 20 mg/mL y 50 mg/mL). En algunas realizaciones, el polipéptido está presente en la solución en más de (o por lo menos o igual a) 5 (por ejemplo, mayor de, por lo menos, o igual a: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,

98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 140, o incluso 150) mg/mL. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular en una concentración de más de 2 (por ejemplo, mayor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 o más) mg/mL, pero menos de 55 (por ejemplo, menor de 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o menor de 5) mg/mL. Sin embargo, en algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular en una solución acuosa en una concentración de más de 5 mg/mL y menor de 50 mg/mL. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular en una solución acuosa en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL. Los métodos para formular una proteína en una solución acuosa se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 7,390,786; McNally and Hastedt (2007), "Protein Formulation and Delivery," Second Edition, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Volume 175, CRC Press; y Banga (1995), "Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems," CRC Press. En algunas realizaciones, la solución acuosa tiene un pH neutro, por ejemplo, un pH entre, por ejemplo, 6.5 y 8 (por ejemplo, entre e inclusive de 7 y 8). En algunas realizaciones, la solución acuosa tiene un pH de aproximadamente 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, o 8.0. En algunas realizaciones, la solución acuosa tiene un pH de más de (o igual a) 6 (por ejemplo, mayor de o igual a 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, o 7.9), pero menor de pH 8.

25

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de unión a C5 se puede incorporar dentro de una construcción de gen que se va a utilizar como parte de un protocolo de terapia de gen para suministrar ácidos nucleicos que se pueden utilizar para expresar y producir agentes dentro de las células (véase adelante).

Las construcciones de expresión de dichos componentes se pueden administrar en cualquier portador terapéuticamente efectivo, por ejemplo cualquier formulación o composición capaz de suministrar efectivamente el gen componente a las células in vivo. Los métodos incluyen la inserción del gen del sujeto en vectores víricos que incluyen retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adeno asociado, lentivirus, y virus de herpes simplex 1 (HSV-1), o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Los vectores víricos pueden transfectar las células directamente; el ADN de plásmido se pueden suministrar con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o derivados (por ejemplo, anticuerpo conjugado), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas víricas artificiales u otros dichos portadores intracelulares, así como también la inyección directa de la construcción de gen o precipitación de CaPO_4 (véase, por ejemplo, WO04/060407) llevada a cabo in vivo. (Véase también, "Ex vivo Approaches," adelante). Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que

40

se conocen por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Eglitis et al. (1985) *Science* 230: 1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J Immunol* 150:4104-4115; Patente Estadounidense Nos. 4,868,116 y 4,980,286; Publicación PCT Nos. WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345, y WO92/07573). Otro sistema de suministro de gen vírico utiliza vectores derivados de adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Los vectores adenovíricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 o otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc). se conocen por aquellos expertos en la técnica. Todavía otro sistema de vector vírico útil para el suministro del gen del sujeto es el virus adeno asociado (AAV). Véase, por ejemplo, Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828; y McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62: 1963-1973.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede formular con uno o más agentes activos adicionales útiles para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento (por ejemplo, un trastorno asociado con AP o un trastorno asociado con CP) en un sujeto. Los agentes adicionales para tratar un trastorno asociado con complemento en un sujeto variará dependiendo del trastorno particular que se va a tratar, pero puede incluir, sin limitación, un antihipertensivo (por ejemplo, un inhibidor de enzima que se convierte a angiotensina) [para uso en tratar, por ejemplo, síndrome HELLP], un anticoagulante, un corticosteroide (por ejemplo, prednisona), o un agente inmunosupresor (por ejemplo, vincristina o ciclosporina A). Ejemplos de anticoagulantes incluyen, por ejemplo, warfarina (Coumadina), aspirina, heparina, fenindiona, fondaparinux, idraparinux, e inhibidores trombina (por ejemplo, argatroban, lepirudin, bivalirudin, o dabigatran). Un polipéptido de unión a C5 descrito aquí también se puede formular con un agente fibrinolítico (por ejemplo, ancrod, ácido ϵ -aminocaproico, antiplasmin-a₁, prostaciclina, y defibrotide) para el tratamiento de un trastorno asociado con complemento. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular con un agente que disminuye lípido tal como un inhibidor de reductasa hidroximetilglutarilo CoA. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular con, o para uso con, un agente anti-CD20 tal como rituximab (Rituxan™; Biogen Idec, Cambridge, MA). En algunas realizaciones, por ejemplo, para el tratamiento de RA, el polipéptido de unión a C5 se puede formular con uno o ambos de infliximab (Remicade®;

Centocor, Inc). y metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®). En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede formular con un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID). Están disponibles muchos NSAIDS diferentes, algunos de venta libre incluyen ibuprofeno (Advil®, Motrin®, Nuprin ®) y

5 naproxeno (Alleve®) y muchos otros están disponibles mediante prescripción que incluye meloxicam (Mobic®), etodolac (Lodine®), nabumetona (Relafen®), sulindac (Clinoril®), toleментina (Tolectin®), salicilato de colina de magnesio (Trilasate®), diclofenaco (Cataflam®, Voltaren®, Arthrotec®), Diflusal (Dolobid®), indometicina (Indocin®), Ketoprofeno (Orudis®, Oruvail®), Oxaprozin

10 (Daypro®), y piroxicam (Feldene®). En algunas realizaciones un polipéptido de unión a C5 se puede formular para uso con un anti-hipertensivo, un agente anti-convulsión (por ejemplo, sulfato de magnesio), o un agente anti-trombótico. Los anti-hipertensivos incluyen, por ejemplo, labetalol, hidralazina, nifedipina, antagonistas del canal de calcio, nitroglicerina, o nitroprusiato de sodio. (Véase,

15 por ejemplo, Mihu et al. (2007) J Gastrointestin Liver Dis 16(4):419-424). Los agentes anti-trombóticos incluyen, por ejemplo, heparina, antitrombina, prostaciclina, o aspirina de dosis bajas.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se

20 puede formular para administración (por ejemplo, administración intrapulmonar) con por lo menos un agente activo adicional para tratar un trastorno pulmonar. Por lo menos un agente activo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE (por ejemplo, omalizumab), un anticuerpo anti-IL-4 o un anticuerpo anti-IL-5, un inhibidor anti-IgE (por ejemplo, montelukast sodio), un simpatomimético (por

25 ejemplo, albuterol), un antibiótico (por ejemplo, tobramicina), un desoxirribonucleasa (por ejemplo, pulmozima), un fármaco anticolinérgico (por ejemplo, bromuro ipratropio), un corticosteroide (por ejemplo, dexametasona), un agonista de β -adrenoreceptor, un inhibidor leucotrieno (por ejemplo, zileuton), un inhibidor 5 -lipoxigenasa, un inhibidor PDE, un antagonista CD23, un antagonista

30 IL-13, un inhibidor de liberación de citoquina, un antagonista del receptor de histamina H1, una anti-histamina, un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, cromolin sodio), o un inhibidor de liberación de histamina.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se

35 puede formular para administración con uno o más agentes terapéuticos adicionales para uso en tratar un trastorno ocular asociado con complemento. Dichos agentes terapéuticos adicionales pueden ser, por ejemplo, bevacizumab o el fragmento Fab de bevacizumab o ranibizumab, ambos vendidos por Roche Pharmaceuticals, Inc., y pegaptanib sodio (Mucogen®; Pfizer, Inc).. Dicho equipo

40 también, opcionalmente, puede incluir instrucciones para administrar el polipéptido de unión a C5 a un sujeto.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede formular para administración a un sujeto junto con terapia de globulina gama intravenosa (IVIG), plasmaféresis, reemplazo de plasma, o intercambio de plasma. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede formular para uso antes, durante, o después de, un trasplante de riñón.

Cuando un polipéptido de unión a C5 se utiliza en combinación con un segundo agente activo, los agentes se pueden formular en forma separada o conjunta. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas respectivas se pueden mezclar, por ejemplo, justo antes de administración, y administrar juntos o se pueden administrar en forma separada, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos diferentes (véase adelante).

Como se describió anteriormente, se puede formular una composición de tal manera que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de unión a C5 descrito aquí. En algunas realizaciones, se puede formular una composición para incluir una cantidad sub-terapéutica de un polipéptido de unión a C5 y una cantidad sub-terapéutica de uno o más agentes activos adicionales de tal manera que los componentes en total son terapéuticamente efectivos para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento (por ejemplo, un trastorno de complemento asociado con la ruta de complemento alternativa o un trastorno asociado con la ruta de complemento clásica) en un sujeto. Los métodos para determinar una dosis terapéuticamente efectiva de un agente tal como un anticuerpo terapéutico se conocen en la técnica y se describen aquí.

Aplicaciones

Los polipéptidos de unión a C5, conjugados de los mismos, y composiciones de cualquiera de los anteriores se pueden utilizar en una serie de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, se pueden utilizar polipéptidos de unión a C5 marcados detectablemente en ensayos para detectar la presencia o cantidad de C5 presente en una muestra biológica. Los métodos adecuados para utilizar los anticuerpos en ensayos diagnósticos se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, ELISA, aplicaciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, Western blot, y técnicas dot blot. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, supra y Ausubel et al, supra.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden utilizar como controles positivos en ensayos diseñados para identificar compuestos novedosos adicionales para tratar los trastornos mediados por complemento. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 que inhibe la formación del complemento terminal y/o la producción C5a se puede utilizar como un control positivo en un ensayo para identificar compuestos adicionales (por ejemplo,

moléculas pequeñas, aptámeros, o anticuerpos) que reducen o abrogan la producción de C5a o la formación de MAC.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 de ratón descritos aquí se pueden utilizar como un anticuerpo sustituto en modelos de ratón de enfermedad humana. Esto puede ser especialmente útil cuando un polipéptido de unión a C5 humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5 de cadena sencilla) no reacciona en forma cruzada con C5 de ratón y/o es probable que provoque una respuesta de anticuerpo anti-humano en un ratón al que se administra el anticuerpo humanizado.

De acuerdo con lo anterior, un investigador que espera estudiar el efecto de un polipéptido de unión a C5 en tratar una enfermedad (por ejemplo, AMD, asma, o RA) puede utilizar el polipéptido de unión a C5 de ratón descrito aquí en un modelo de ratón apropiado de la enfermedad. Si el investigador puede establecer la eficacia en el modelo de ratón de enfermedad utilizando el polipéptido de unión a C5 de ratón, los resultados pueden establecer prueba de concepto para uso de un polipéptido de unión a C5 humano en tratamiento de la enfermedad en humanos.

Los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí también se pueden utilizar en métodos terapéuticos como se elabora adelante.

Métodos para Tratamiento

Las composiciones descritas anteriormente (por ejemplo, cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí o composiciones farmacéuticas de los mismos) son útiles en, inter alia, métodos para tratar o evitar una variedad de trastornos asociados con complemento (por ejemplo, trastornos asociados AP o trastornos asociados CP) en un sujeto. Las composiciones se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, utilizando una variedad de métodos que dependen, en parte, de la ruta de administración. La ruta puede ser, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), inyección intraperitoneal (IP), inyección intrapulmonar, inyección intraocular, inyección intraarticular, o inyección intramuscular (IM).

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se suministra terapéuticamente a un sujeto por medio de administración local. Como se utiliza aquí, "administración local" o "suministro local," se refiere al suministro que no se basa en el transporte de la composición o agente a su tejido objetivo destinado o sitio por medio del sistema vascular. Por ejemplo, la composición se puede suministrar mediante inyección o implantación de la composición o agente o mediante inyección o implantación de un dispositivo que contiene la composición o

agente. Luego de administración local en la vecindad de un tejido o sitio objetivo, la composición o agente, o uno o más componentes de los mismos, se puede difundir al tejido o sitio objetivo destinado.

- 5 En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar localmente a una articulación (por ejemplo, una articulación). Por ejemplo, en realizaciones en donde el trastorno asociado con complemento es artritis, el polipéptido se puede administrar directamente a una articulación (por ejemplo, en el espacio de una articulación) o en la vecindad de una articulación.
- 10 Ejemplos de articulaciones intraarticulares a las que un polipéptido de unión a C5 se puede administrar localmente incluyen, por ejemplo, cadera, rodilla, codo, muñeca, esternoclavicular, temperomandibular, del carpo, del tarso, tobillo, y cualquier otra articulación sometida a condiciones artríticas. Un polipéptido de unión a C5 también se puede administrar a una bolsa tal como, por ejemplo,
- 15 acromión, bicipitorradial, cubitorradial, deltoides, infrarrotuliana, isquiática, y cualquier otro bolsa se conocen en la técnica de la medicina.

- En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar localmente al ojo, por ejemplo, para tratar pacientes afligidos con un
- 20 trastorno ocular asociado con complemento tal como AMD húmedo o seco. Como se utiliza aquí, el término "ojo" se refiere a cualquiera y todos los tejidos anatómicos y estructuras asociadas con un ojo. El ojo tiene una pared compuesta de tres capas distintas: la externa esclerótica la media corioidea, y la interna retina. La cámara detrás de los lentes se llena con un fluido gelatinoso denominado como
- 25 el humor vítreo. Al respaldo del ojo está la retina, que detecta la luz. La cornea es un tejido ópticamente transparente, que transporta imágenes al respaldo del ojo. La cornea incluye una ruta para la permeación de fármacos en el ojo. Otras estructuras de tejido anatómico asociadas con el ojo incluyen el sistema de drenaje lacrimal, que incluye un sistema secretor, un sistema distributivo y un
- 30 sistema excretor. El sistema secretor comprende secretores que se estimulan por parpadeo y cambio de temperatura debido a evaporación de lágrimas y refleja secretores que tienen un suministro de nervio parasimpático eferente y secreta lágrimas en respuesta al estímulo físico o emocional. El sistema distributivo incluye los párpados y los meniscos lacrimales alrededor de los bordes de los
- 35 párpados de un ojo abierto, que esparcen lágrimas sobre la superficie ocular por parpadeo, reduciendo así que se desarrollen áreas secas.

- En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se administra a la cámara posterior del ojo. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5
- 40 se administra intravitrealmente. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se administra trans-escleróticamente.

En algunas realizaciones, por ejemplo, en realizaciones para el tratamiento o prevención de un trastorno pulmonar asociado con complemento tal como COPD o asma, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí también se puede administrar a un sujeto por medio del pulmón. El suministro de fármaco pulmonar se puede lograr mediante inhalación, y la administración mediante inhalación aquí puede ser oral y/o nasal. Ejemplos de dispositivos farmacéuticos para el suministro pulmonar incluyen inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco (DPI), y nebulizadores. Por ejemplo, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar a los pulmones de un sujeto por medio de un inhalador de polvo seco. Estos inhaladores dispositivos libres de propulsores que suministran formulaciones de polvo seco estable y dispersable a los pulmones. Los inhaladores de polvo seco se conocen bien en la técnica de medicina e incluyen, sin limitación: el inhalador TurboHaler® (AstraZeneca; Londres, Inglaterra) AIR® (Alkermes®; Cambridge, Massachusetts); Rotahaler® (GlaxoSmithKline; Londres, Inglaterra); y Eclipse™ (Sanofi-Aventis; Paris, Francia). Véase también, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO 04/026380, WO 04/024156, y WO 01/78693. Se han utilizado dispositivos DPI para la administración pulmonar de polipéptidos tal como insulina y hormona de crecimiento. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede administrar intrapulmonarmente por medio de un inhalador de dosis medida. Estos inhaladores se basan en un propulsor para suministrar una dosis discreta de un compuesto a los pulmones. Ejemplos de compuestos administrados por los inhaladores de dosis medida incluyen, por ejemplo, Astovent® (Boehringer-Ingelheim; Ridgefield, Connecticut) y Flovent® (GlaxoSmithKline). Véase también, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,170,717; 5,447,150; y 6,095,141.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se puede administrar a los pulmones de un sujeto por medio de un nebulizador. Los nebulizadores utilizan aire comprimido para suministrar un compuesto como un aerosol licuificado o niebla. Un nebulizador puede ser, por ejemplo, un nebulizador de chorro (por ejemplo, nebulizadores de aire o de chorro líquido) o un nebulizador ultrasónico. Se establecen dispositivos adicionales y métodos de administración intrapulmonar en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Nos. 20050271660 y 20090110679, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se administra por medio de administración intrapulmonar a un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, uno o más de los polipéptidos de unión a C5 se pueden suministrar por medio de un nebulizador o un inhalador a un sujeto (por ejemplo, un humano) afligido con un trastorno pulmonar asociado con complemento tal como asma o COPD.

Se entiende que en algunas realizaciones uno o más de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden administrar sistémicamente para uso en tratar, por ejemplo, RA, AMD húmedo o seco, asma, y/o COPD.

5 Una dosis adecuada de un polipéptido de unión a C5 descrito aquí, cuya dosis es capaz de tratar o evitar a trastorno asociado con complemento en un sujeto, puede depender de una variedad de factores que incluyen, por ejemplo, la edad, sexo, y peso de un sujeto que se va a tratar y el compuesto de inhibidor particular utilizado. Por ejemplo, se puede requerir una dosis diferente de un
10 polipéptido de unión a C5 para tratar un sujeto anciano con RA cuando se compara con la dosis de un polipéptido de unión a C5 que se requiere para tratar un sujeto más joven. Otros factores que afectan la dosis administrada al sujeto incluyen, por ejemplo, el tipo o la severidad del trastorno asociado con complemento. Por ejemplo, un sujeto que tiene RA puede requerir la
15 administración de una dosificación diferente de un polipéptido de unión a C5 que un sujeto con AMD. Otros factores pueden incluir, por ejemplo, otros trastornos médicos concurrentemente o que afectan previamente el sujeto, la salud general del sujeto, la disposición genética del sujeto, dieta, tiempo de administración, índice de excreción, combinación de fármacos, y cualesquier otros agentes
20 terapéuticos adicionales que se administran al sujeto. También cabe entender que una dosificación específica y régimen de tratamiento para cualquier sujeto particular dependerá del juicio del practicante médico que trata (por ejemplo, doctor o enfermera).

25 Un anticuerpo descrito aquí se puede administrar como una dosis fija, o en una dosis de miligramo por kilogramo (mg/kg). En algunas realizaciones, la dosis también se puede seleccionar para reducir o evitar la producción de anticuerpos u otras respuestas inmunes del anfitrión contra uno o más de los anticuerpos activos en la composición. Aunque de una forma que no pretende ser limitante, las
30 dosificaciones de ejemplo de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, 1-100 µg/kg, 0.5-50 µg/kg, 0.1-100 µg/kg, 0.5-25 µg/kg, 1-20 µg/kg, y 1-10 µg/kg, 1-100 mg/kg, 0.5-50 mg/kg, 0.1-100 mg/kg, 0.5-25 mg/kg, 1-20 mg/kg, y 1-10 mg/kg.

Las dosificaciones de ejemplo de un anticuerpo descrito aquí incluyen, sin
35 limitación, 0.1 µg/kg, 0.5 µg/kg, 1.0 µg/kg, 2.0 µg/kg, 4 µg/kg, y 8 µg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4 mg/kg, y 8 mg/kg.

Una composición farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descrito aquí. Dichas cantidades efectivas se pueden
40 determinar fácilmente por una persona medianamente versada en la técnica con base, en parte, en el efecto del anticuerpo administrado, o el efecto combinatorial del anticuerpo y uno o más agentes activos adicionales, si se utiliza más de un agente. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descrito aquí

también puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo (y uno o más agentes activos adicionales) para provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, alivio de por lo menos un parámetro de la afección, por ejemplo, alivio de por lo menos un síntoma del trastorno asociado con complemento. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de unión a C5 puede inhibir (disminuir la severidad de o eliminar la ocurrencia de) y/o evitar un trastorno particular, y/o uno cualquiera de los síntomas del trastorno particular se conocen en la técnica o se describen aquí. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que cualesquier efectos tóxicos o perjudiciales de la composición se pondera por los efectos terapéuticamente benéficos.

Las dosis humanas adecuadas de cualquiera de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden evaluar adicionalmente en, por ejemplo, estudios de escalación de dosis de Fase I. Véase, por ejemplo, van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8): 1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13 (2, part I) :523-531; y Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

Aunque no se preste limitar de ninguna forma, los métodos de ejemplo de administración para un anticuerpo de cadena sencilla tal como un anticuerpo anti-C5 de cadena sencilla (que inhibe la división de C5) se describen en, por ejemplo, Granger et al. (2003) *Circulation* 108: 1184; Haverich et al. (2006) *Ann Thorac Surg* 82:486-492; y Testa et al. (2008) *J Thorac Cardiovasc Surg* 136(4): 884-893.

Los términos "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva," o términos similares utilizados aquí pretenden significar una cantidad de un agente que provocará la respuesta médica o biológica deseada (por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de un trastorno asociado con complemento). En algunas realizaciones, una composición descrita aquí contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de unión a C5. En algunas realizaciones, la composición contiene cualquiera polipéptidos de unión a C5 descritos aquí y uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, o 11 o más) agentes terapéuticos adicionales de tal manera que la composición como un todo es terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, una composición puede contener un polipéptido de unión a C5 descrito aquí y un agente inmunosupresor, en donde el polipéptido y agente están cada uno en una concentración que cuando se combina son terapéuticamente efectivos para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento en un sujeto.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichas composiciones se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos conocidos en cultivos celulares o animales experimentales (por ejemplo, modelos de animal de cualquiera de los trastornos asociados con complemento descritos aquí).

5

Estos procedimientos se pueden utilizar, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefiere un polipéptido de unión a C5 que exhibe un alto índice terapéutico. Aunque se pueden utilizar composiciones que exhiben efectos colaterales tóxicos, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirige dichos compuestos al sitio del tejido afectado y para minimizar el daño potencial a células normales y, por lo tanto, reducir los efectos colaterales.

15

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios de animal se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos anticuerpos se basa de manera general dentro de un rango de concentraciones circulantes de los polipéptidos de unión a C5 que incluye el ED₅₀ con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para un polipéptido de unión a C5 utilizado como se describe aquí (por ejemplo, para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento), la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos de animal para lograr un rango de concentración de plasma circulante que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de los síntomas media máxima) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño o mediante ELISA.

30

En algunas realizaciones, los métodos se pueden realizar en conjunto con otras terapias para trastornos asociados con complemento. Por ejemplo, la composición se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo, antes de, o después de, plasmáféresis, terapia IVIG, reemplazo de plasma, o intercambio de plasma. Véase, por ejemplo, Appel et al. (2005) J Am Soc Nephrol 16: 1392-1404. En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí no se administra en conjunto con IVIG. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo, antes de, o después de, un trasplante de riñón.

40

Un "sujeto," como se utiliza aquí, puede ser cualquier mamífero. Por ejemplo, un sujeto puede ser un humano, un primate diferente a humano (por ejemplo, mono, babuino, o chimpancé), un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un conejo, un conejillo de indias, a jerbo, un hámster, una rata, o un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un niño (por ejemplo, un niño humano).

Como se utiliza aquí, un sujeto "en necesidad de prevención," "en necesidad de tratamiento," o "en necesidad del mismo," se refiere a uno, quien mediante el juicio de un prácticamente médico apropiado (por ejemplo, un doctor, una enfermera, o un practicante de enfermera en el caso de seres humanos; un veterinario en el caso de mamíferos diferentes a los humanos), sería razonablemente benéfico de un tratamiento dado (tal como tratamiento con una composición que comprende un polipéptido de unión a C5).

Como se describió anteriormente, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos asociados con complemento tal como, por ejemplo, trastornos asociados con AP y/o trastornos asociados con CP. Dichos trastornos incluyen, sin limitación, artritis reumatoide (RA); síndrome de anticuerpo antifosfolípido; nefritis por lupus; enfermedades pulmonares; lesión de isquemia-reperfusión; síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS); síndrome urémico hemolítico infeccioso o típico (tHUS); enfermedad de depósito denso (DDD); hemoglobinuria nocturna paroxismal (PNH); neuromielitis óptica (NMO); neuropatía motriz multifocal (MMN); esclerosis múltiple (MS); degeneración macular (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD)); hemólisis, enzimas de hígado elevadas, y síndrome de plaquetas bajas (HELLP); púrpura trombocitopénica trombótica (TTP); pérdida fetal espontánea; vasculitis inmunológica de Pauci; epidermólisis ampollar; pérdida fetal recurrente; y lesión traumática de cerebro. (Véase, por ejemplo, Holers (2008) Immunological Reviews 223:300-316 y Holers and Thurman (2004) Molecular Immunology 41: 147-152). En algunas realizaciones, el trastorno asociado con complemento es un trastorno vascular asociado con complemento tal como, pero no limitado a, un trastorno cardiovascular, miocarditis, un trastorno cerebrovascular, un trastorno vascular periférico (por ejemplo, musculoesquelético), un trastorno renovascular, un trastorno vascular mesentérico/entérico, revascularización para trasplantes y/o replantes, vasculitis, nefritis púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis asociada con lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada con artritis reumatoide, vasculitis de complejo inmune, enfermedad de Takayasu, cardiomiopatía dilatada, angiopatía diabética, enfermedad de Kawasaki (arteritis), émbolo de gas venoso (VGE), y reestenosis luego de colocación de stents, aterectomía rotacional, y angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA). (Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense no. 20070172483). Los trastornos asociados con

complemento adicionales incluyen, sin limitación, MG, CAD, dermatomiositis, enfermedad de Graves, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Degos, rechazo de injerto (por ejemplo, rechazo de trasplante), sepsis de respuesta inflamatoria sistémica, choque séptico, lesión de médula espinal, glomerulonefritis, tiroiditis de Hashimoto, diabetes tipo I, soriasis, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune (AIHA), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), síndrome de Goodpasture, síndrome de antifosfolípido (APS), y APS catastrófico (CAPS). Las enfermedades pulmonares incluyen, por ejemplo, trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), asma, fibrosis pulmonar, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterans, y sarcoidosis. Los trastornos pulmonares adicionales que se pueden tratar o evitar utilizando las composiciones y métodos descritos aquí se establecen en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20050271660. En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí se pueden utilizar en métodos para tratar microangiopatía trombótica (TMA), por ejemplo, TMA asociado con un trastorno asociado con complemento tal como cualquiera de los trastornos asociados con complemento descritos aquí.

Como se utiliza aquí, un sujeto "está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con complemento" (por ejemplo, un trastorno asociado con AP o un trastorno asociado con CP) es un sujeto que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho o más) factores de riesgo para desarrollar el trastorno. Los factores de riesgo variarán dependiendo del trastorno particular asociado con complemento, pero se conocen bien en la técnica de medicina. Por ejemplo, los factores de riesgo para desarrollar DDD incluyen, por ejemplo, una predisposición a desarrollar la afección, es decir, una historia familiar de la afección o una predisposición genética para desarrollar la afección tal como, por ejemplo, una o más mutaciones en el gen que codifica el factor de complemento H (CFH), factor de complemento H relacionado 5 (CFHR5), y/o componente de complemento C3 (C3). Dichas mutaciones asociadas con DDD como métodos bien conocidos para determinar si un sujeto lleva una o más de las mutaciones se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Licht et al. (2006) *Kidney Int* 70:42-50; Zipfel et al. (2006) "The role of complement in membranoproliferative glomerulonephritis," In: *Complement and Kidney Disease*, Springer, Berlin, páginas 199-221; Ault et al. (1997) *J Biol Chem* 272:25168-75; Abrera-Abeleda et al. (2006) *J Med Genet* 43: 582-589; Poznansky et al. (1989) *J Immunol* 143:1254-1258; Jansen et al. (1998) *Kidney Int* 53:331-349; y Hegasy et al. (2002) *Am J Pathol* 161: 2027-2034. Sin embargo, un humano que está en riesgo de desarrollar DDD puede ser, por ejemplo, uno que tiene una o más mutaciones asociadas con DDD en el gen que codifica CFH o uno con una historia familiar para desarrollar la enfermedad.

Los factores de riesgo para TTP se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, una predisposición para desarrollar la afección, es decir, una historia familiar de la afección o una predisposición genética para desarrollar la afección tal como, por ejemplo, una o más mutaciones en el gen ADAMTS13. Las mutaciones ADAMTS13 asociadas con TTP se revisan en detalle en, por ejemplo, Levy et al. (2001) *Nature* 413:488-494; Kokame et al. (2004) *Semin Hematol* 41: 34-40; Licht et al. (2004) *Kidney Int* 66:955-958; y Noris et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:1177-1183. Los factores de riesgo para TTP también incluyen aquellas afecciones o agentes que se conocen por precipitar TTP, o recurrencia de TTP, tal como, pero no limitado a, cáncer, infecciones bacterianas (por ejemplo, infecciones por *Bartonella* sp.), infecciones víricas (por ejemplo, VIH y virus de sarcoma de Kaposi), embarazo, o cirugía. Véase, por ejemplo, Avery et al. (1998) *Am J Hematol* 58:148-149 y Tsai, supra. TTP, o recurrencia de TTP, también se ha asociado con el uso de ciertos agentes terapéuticos (fármacos) que incluyen, por ejemplo, ticlopidina, FK506, corticosteroides, tamoxifen, o ciclosporina A (véase, por ejemplo, Gordon et al. (1997) *Semin Hematol* 34(2): 140-147). Adelante, dichas manifestaciones de TTP, cuando sea apropiado, se pueden denominar como, por ejemplo, "TTP asociado a infección," "TTP asociado con embarazo," o "TTP asociado con fármaco." Sin embargo, un humano que está en riesgo de desarrollar TTP puede ser, por ejemplo, uno quien tiene una o más mutaciones asociadas con TTP en el gen ADAMTS13. Un humano está en riesgo de desarrollar una forma recurrente de TTP puede ser uno, por ejemplo, quien tiene TTP y tiene una infección, está embarazado, o experimenta cirugía.

Los factores de riesgo para aHUS se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, una predisposición a desarrollar la afección, es decir, una historia familiar de la afección o una predisposición genética a desarrollar la afección tal como, por ejemplo, una o más mutaciones en el Factor H de complemento (CFH), proteína de cofactor de membrana (MCP; CD46), proteína de unión a C4b, factor de complemento B (CFB), o factor de complemento I (CFI). (Véase, por ejemplo, Warwicker et al. (1998) *Kidney Int* 53:836-844; Richards et al. (2001) *Am J Hum Genet* 68:485-490; Caprioli et al. (2001) *Am Soc Nephrol* 12: 297-307; Neuman et al. (2003) *J Med Genet* 40: 676-681; Richards et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12966- 12971; Fremeaux-Bacchi et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 17:2017-2025; Esparza-Gordillo et al. (2005) *Hum Mol Genet* 14:703-712; Goicoechea de Jorge et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (1): 240-245; Blom et al. (2008) *J Immunol* 180 (9): 6385-91; y Fremeaux-Bacchi et al. (2004) *J Med Genet* 41: e84). (Véase también Kavanagh et al. (2006) supra). Los factores de riesgo también incluyen, por ejemplo, infección con *Streptococcus pneumoniae*, embarazo, cáncer, exposición a agentes anti-neoplásicos (por ejemplo, quinina, mitomicina C, cisplatina, o bleomicina), exposición a agentes inmunoterapéuticos (por ejemplo, ciclosporina, OKT3, o interferón), exposición a agentes anti-plaqueta (por ejemplo, ticlopidina o clopidogrel), infección por VIH, trasplante, enfermedad

autoinmune, y aciduria y homocistinuria metilmalónica combinada (cblC). Véase, por ejemplo, Constantinescu et al. (2004) *Am J Kidney Dis* 43:976-982; George (2003) *Curr Opin Hematol* 10:339-344; Gottschall et al. (1994) *Am J Hematol* 47: 283-289; Valavaara et al. (1985) *Cancer* 55:47-50; Miralbell et al. (1996) *J Clin Oncol* 14:579-585; Dragon-Durey et al. (2005) *J Am Soc Nephrol* 16:555-63; y Becker et al. (2004) *Clin Infect Dis* 39: S267-S275.

Los factores de riesgo para HELLP se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, multiparidad de embarazos, edad maternal durante 25 años, raza Caucásica, la ocurrencia de preeclampsia o HELLP en un embarazo previo, y una historia de pobre resultado de embarazo. (Véase, por ejemplo, Sahin et al. (2001) *Nagoya Med J* 44(3): 145 -152; Sullivan et al. (1994) *Am J Obstet Gynecol* 171: 940-943; y Padden et al. (1999) *Am Fam Physician* 60(3): 829-836). Por ejemplo, una mujer caucásica, embarazada quien ha desarrollado preeclampsia durante un primer embarazo puede ser uno que está en riesgo de desarrollar el síndrome HELLP durante, o luego de, un segundo embarazo.

Los factores de riesgo para CAD se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, afecciones o agentes que se saben precipitan CAD, o tienen recurrencia en CAD, tal como, pero no limitado a, neoplasmas o infecciones (por ejemplo, infecciones bacterianas y víricas).

Las afecciones conocidas por estar asociadas con el desarrollo de CAD incluyen, por ejemplo, infección por VIH (y SIDA), infección por hepatitis C, infección por neumonía de *Mycoplasma*, infección por virus Epstein-Barr (EBV), infección por citomegalovirus (CMV), rubeola, o mononucleosis infecciosa. neoplasmas asociados con CAD incluyen, sin limitación, linfoma no Hodgkin. Adelante, dichas manifestaciones de CAD, según sea apropiado, se puede denominar como, por ejemplo, "CAD asociado con infección" o "CAD asociado con neoplasma CAD." Sin embargo, un humano que está en riesgo de desarrollar CAD puede ser, por ejemplo, uno quien tiene una infección por VIH, rubeola, o un linfoma. Véase también, por ejemplo, Gertz (2006) *Hematology* 1: 19-23; Horwitz et al. (1977) *Blood* 50:195-202; Finland and Barnes (1958) *AMA Arch Intern Med* 191: 462-466; Wang et al. (2004) *Acta Paediatr Taiwan* 45:293-295; Michaux et al. (1998) *Ann Hematol* 76:201-204; y Chang et al. (2004) *Cancer Genet Cytogenet* 152:66-69.

Los factores de riesgo para miastenia gravis (MG) se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, una predisposición a desarrollar la afección, es decir, una historia familiar de la afección o una predisposición genética a desarrollar la afección tal como MG familiar. Por ejemplo, algunos tipos de HLA están asociados con un riesgo aumentado de desarrollar MG. Los factores

de riesgo para MG incluyen la ingestión o exposición a ciertos fármacos que inducen MG tal como, pero no limitado a, D-penicilamina. Véase, por ejemplo, Drosos et al. (1993) Clin Exp Rheumatol 11(4):387-91 y Kaeser et al. (1984) Acta Neurol Scand Suppl 100:39-47. Como el MG puede ser episódico, un sujeto quien ha experimentado previamente uno o más síntomas para tener MG puede estar en riesgo de recaída. Sin embargo, un humano que está en riesgo de desarrollar MG puede ser, por ejemplo, uno quien tiene una historia familiar de MG y/o uno quien ha ingerido o se le ha administrado un fármaco que induce MG tal como D-penicilamina.

Como se utiliza aquí, un sujeto "está en riesgo de desarrollar CAPS" es un sujeto que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o ocho o más) factores de riesgo para desarrollar el trastorno. Aproximadamente 60% de las incidencias de CAPS se preceden por un evento precipitante tal como una infección. Sin embargo, los factores de riesgo para CAPS incluyen aquellas condiciones para precipitar CAPS tal como, pero no limitado a, ciertos cánceres (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer de ovario, linfoma, leucemia, cáncer endometrial, adenocarcinoma, y cáncer de pulmón), embarazo, puerperio, trasplante, APS primario, artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), cirugía (por ejemplo, cirugía ocular), y ciertas infecciones. Las infecciones incluyen, por ejemplo, infección por parvovirus B19 e infección por hepatitis C. Adelante, dichas manifestaciones se CAPS se pueden denominar como, por ejemplo, "CAPS asociado con cáncer," "CAPS asociado con trasplante," "CAPS asociado con RA," "CAPS asociado con infección," o "CAPS asociado con SLE." Véase, por ejemplo, Soltesz et al. (2000) Haematologia (Budep) 30(4): 303-311; Ideguchi et al. (2007) Lupus 16(1): 59-64; Manner et al. (2008) Am J Med Sci 335(5): 394-7; Miesbach et al. (2006) Autoimmune Rev 6(2):94-7; Gomez -Puerta et al. (2006) Autoimmune Rev 6(2):85-8; Gomez-Puerta et al. (2006) Semin Arthritis Rheum 35(5): 322-32; Kasamon et al. (2005) Haematologia 90(3):50-53; Atherson et al. (1998) Medicine 77(3): 195-207; y Canpolat et al. (2008) Clin Pediatr 47(6): 593-7. Sin embargo, un humano que está en riesgo de desarrollar CAPS puede ser, por ejemplo, uno quien tiene CAPS primario y/o un cáncer que se conoce se asocia con CAPS.

A partir de lo anterior será claro que los sujetos que "están en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con complemento" (por ejemplo, un trastorno asociado con AP o un trastorno asociado con CP) no son todos sujetos dentro de una especie de interés.

Un sujeto "se sospecha que tiene un trastorno asociado con complemento" (por ejemplo, un trastorno asociado con la ruta de complemento alternativo) es uno que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o 10 o más) síntomas de la enfermedad. Los síntomas de estos trastornos

variarán dependiendo del trastorno particular, pero se conocen por aquellos expertos en la técnica de la medicina. Por ejemplo, los síntomas de DDD incluyen, por ejemplo: uno o ambos de hematuria y proteinuria; síndrome nefrítico agudo; desarrollo de drusas y/o deterioro visual; lipodistrofia parcial adquirida y complicaciones de los mismos; y la presencia del factor nefrítico C3 en suero (C3NeF), un auto-anticuerpo dirigido contra C3bBb, la convertasa C3 de la ruta de complemento alternativa. (Véase, por ejemplo, Appel et al. (2005), supra). Los síntomas de aHUS incluyen, por ejemplo, hipertensión severa, proteinuria, uremia, letargo/fatiga, irritabilidad, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, y deterioro de la función renal (por ejemplo, falla renal aguda). Los síntomas de TTP incluyen, por ejemplo, microtrombos, trombocitopenia, fiebre, expresión o actividad de metaloproteinasa ADAMTS13 baja, anormalidades del sistema nervioso central fluctuante, falla renal, anemia hemolítica microangiopática, hematomas, purpura, náusea y vómito (por ejemplo, que resulta de isquemia en el tracto GI o de involucramiento del sistema nervioso central), dolor de pecho debido a isquémica cardíaca, convulsiones, y dolor de músculo y articulación. Los síntomas de RA pueden incluir, por ejemplo, rigidez, inflamación, fatiga, anemia, pérdida de peso, fiebre, y frecuentemente, dolor paralizante. Algunos síntomas comunes de artritis reumatoide incluyen rigidez de articulaciones luego de debilitamiento que finaliza luego de una hora o más; inflamación en un dedo específico o articulaciones de la muñeca; inflamación en el tejido blando alrededor de las articulaciones; e inflamación en ambos lados de la articulación. Puede ocurrir hinchamiento con o sin dolor, y puede empeorar progresivamente o permanecer el mismo durante años antes de evolución. Los síntomas de HELLP se conocen en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, malestar general, dolor epigástrico, náusea, vómito, migraña, dolor del cuadrante derecho superior, hipertensión, proteinuria, visión borrosa, sangrado gastrointestinal, hipoglicemia, parestesia, enzimas de hígado elevadas/daño de hígado, anemia (anemia hemolítica), y conteo bajo de plaquetas, cualquiera de los cuales en combinación con embarazo o embarazo reciente. (Véase, por ejemplo, Tomsen (1995) Am J Obstet Gynecol 172: 1876-1890; Sibai (1986) Am J Obstet Gynecol 162:311-316; y Padden (1999), supra). Los síntomas de PNH incluyen, por ejemplo, anemia hemolítica (un número reducido de glóbulos rojos), hemoglobinuria (la presencia de hemoglobina en la orina particularmente evidente después del sueño), y hemoglobinemia (la presencia de hemoglobina en el torrente sanguíneo). Se sabe que los sujetos afligidos con PNH tienen paroxismos, que se definen aquí como incidencias de orina de color oscura, disfagia, fatiga, disfunción eréctil, trombosis, y dolor abdominal recurrente.

Los síntomas de CAPS se conocen bien en la técnica de la medicina e incluyen, por ejemplo, evidencia histopatológica de múltiples oclusiones de vaso pequeño; la presencia de anticuerpos antifosfolípido (usualmente a título mayor), trombosis vascular, disfunción de múltiples órganos severos, hipertensión maligna,

síndrome de dificultad respiratoria aguda, coagulación intravascular diseminada, anemia hemolítica microangiopática, esquistocitos, y trombocitopenia. El CAPS se puede distinguir de APS en aquellos pacientes con CAPS de manera general presentes con disfunción severa de múltiples órganos o falla, que se caracteriza por isquemia difusa, rápida de vaso pequeño y trombosis que afecta predominantemente los órganos parenquimales. En contraste, el APS se asocia con oclusiones de vaso sanguíneo medio a grande arterial o venoso único. Los síntomas de MG incluyen, por ejemplo, fatiga y un rango de condiciones relacionadas con debilidad de músculo que incluyen: tosis (de uno o ambos ojos), diplopia, marcha inestable, expresiones faciales distorsionadas o deprimidas, y dificultad al masticar, hablar, o tragar. En algunos casos, un sujeto puede presentar parálisis parcial o completa de los músculos respiratorios. Los síntomas de CAD incluyen, por ejemplo, dolor, fiebre, palidez, anemia, flujo reducido de sangre en las extremidades (por ejemplo, con gangrena), y enfermedad renal o falla renal aguda. En algunas realizaciones, los síntomas pueden ocurrir luego de exposición a temperaturas frías.

A partir de lo anterior será claro que los sujetos que "se sospecha tienen un trastorno asociado con complemento" todos no son sujetos dentro de una especie de interés.

En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir identificar el sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con complemento en un sujeto. Los métodos adecuados para identificar el sujeto se conocen en la técnica. Por ejemplo, los métodos adecuados (por ejemplo, técnicas de secuenciamiento o uso de microdisposiciones) para determinar si un sujeto humano tiene una mutación asociada con DDD en un gen CFH, CFHR5, o C3 se describen en, por ejemplo, Licht et al. (2006) *Kidney Int* 70:42-50; Zipfel et al. (2006), supra; Ault et al. (1997) *J Biol Chem* 272:25168-75; Abrera-Abeleda et al. (2006) *J Med Genet* 43:582-589; Poznansky et al. (1989) *J Immunol* 143: 1254-1258; Jansen et al. (1998) 53: 331-349; y Hegasy et al. (2002) *Am J Pathol* 161: 2027-2034. Los métodos para detectar la presencia de depósitos densos de electrones asociados con DDD característicos también se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un practicante médico puede obtener una biopsia de tejido del riñón de un paciente y someter el tejido a microscopía de electrones. El practicante médico también puede examinar el tejido mediante inmunofluorescencia para detectar la presencia de C3 utilizando un anticuerpo anti-C3 y/o microscopía de luz para determinar si existe glomerulonefritis proliferativa de membrana. Véase, por ejemplo, Walker et al. (2007) *Mod Pathol* 20:605-616 y Habib et al. (1975) *Kidney Int* 7:204-215. En algunas realizaciones, la identificación de un sujeto como uno que tiene DDD puede incluir evaluar una muestra de sangre para la presencia de C3NeF. Los métodos para detectar la

presencia de C3NeF en sangre se describen en, por ejemplo, Schwertz et al. (2001) *Pediatr Allergy Immunol* 12: 166-172.

En algunas realizaciones, el practicante médico puede determinar si existe aumento en la activación de complemento en el suero de un sujeto. Los indicios de activación de complemento aumentada incluyen, por ejemplo, una reducción en CH50, una reducción en C3, y un aumento en C3dg/C3d. Véase, por ejemplo, Appel et al. (2005), *supra*. En algunas realizaciones, un practicante médico puede examinar el ojo del sujeto para evidencia del desarrollo de drusas y/o otras patologías visuales tal como AMD. Por ejemplo, un practicante médico puede utilizar pruebas de función retiniana tal como, pero no limitado a, adaptación a la oscuridad, electroretinografía, y electrooculografía (véase, por ejemplo, Colville et al. (2003) *Am J Kidney Dis* 42:E2-5).

Los métodos para identificar un sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, los TTP también se conocen en la técnica. Por ejemplo, Miyata et al. describe una variedad de ensayos para medir la actividad ADAMTS13 en una muestra biológica obtenida de un sujeto (Curr Opin Hematol (2007) 14(3): 277-283). Los ensayos de actividad ADAMTS13 adecuados, así como también rangos fenotípicamente normales de actividad ADAMTS13 en un sujeto humano, se describen en, por ejemplo, Tsai (2003) *J Am Soc Nephrol* 14: 1072-1081; Furlan et al. (1998) *New Engl J Med* 339: 1578-1584; Matsumoto et al. (2004) *Blood* 103: 1305-1310; y Mori et al. (2002) *Transfusion* 42:572-580. Los métodos para detectar la presencia de inhibidores de ADAMTS13 (por ejemplo, autoanticuerpos que se unen al ADAMTS13) en una muestra biológica obtenida de un sujeto se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede mezclar una muestra de suero de un paciente con una muestra de suero de un sujeto sin TTP para detectar la presencia de anticuerpos anti-ADAMTS13. En otro ejemplo, la proteína de inmunoglobulina se puede aislar del suero del paciente y se utiliza en ensayos de actividad in vitro ADAMTS13 para determinar si está presente un anticuerpo anti-ADAMTS13. Véase, por ejemplo, Dong et al. (2008) *Am J Hematol* 83(10):815-817. En algunas realizaciones, el riesgo de desarrollar TTP se puede determinar al evaluar si un paciente lleva una o más mutaciones en el gen ADAMTS13. Los métodos adecuados (por ejemplo, matrices de ácido nucleico o secuenciamiento de ADN) para detectar una mutación en el gen ADAMTS13 se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Levy et al, *supra*; Kokame et al, *supra*; Licht et al, *supra*; y Noris et al, *supra*.

Adicionalmente, los métodos para identificar un sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar aHUS se conocen en la técnica. Por ejemplo, se pueden realizar pruebas de laboratorio para determinar si un sujeto humano tiene trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, o insuficiencia renal aguda. La trombocitopenia se puede diagnosticar por un

profesional médico como uno o más de: (i) un conteo de plaquetas que es menor de 150,000/mm³ (por ejemplo, menor de 60,000/mm³); (ii) una reducción en el tiempo de supervivencia de plaqueta, reflejar la interrupción de plaquetas mejorada en la circulación; y (iii) plaquetas gigantes observadas en frotis de sangre periférica, que es consistente con la activación secundaria de trombocitopoyesis. La anemia hemolítica microangiopática se puede diagnosticar por un profesional médico como uno o más de: (i) concentraciones de hemoglobina que son menores de 10 mg/dL (por ejemplo, menores de 6.5 mg/dL); (ii) concentraciones de deshidrogenasa de lactato de suero aumentadas (LDH) (>460 U/L); (iii) hiperbilirubinemia, reticulocitosis, hemoglobina libre circulante, y concentraciones de haptoglobina no detectables o bajas; y (iv) la detección de glóbulos rojos fragmentados (esquistocitos) con el aspecto típico de equinocito en frotis de sangre periférica junto con una prueba negativa de Coombs. (Véase, por ejemplo, Kaplan et al. (1992) "Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura," Informa Health Care (ISBN 0824786637) y Zipfel (2005) "Complement and Kidney Disease," Springer (ISBN 3764371668)).

También se puede identificar un sujeto que tiene aHUS al evaluar las concentraciones de sangre de C3 y C4 como una medida de activación de complemento o desregulación. Adicionalmente, como es claro a partir de la descripción anterior, un sujeto se puede identificar que tiene aHUS genético al identificar el sujeto por albergar una o más mutaciones en un gen asociado con aHUS tal como CFI, CFB, CFH, o MCP (supra). Los métodos adecuados para detectar una mutación en un gen incluyen, por ejemplo, secuenciamiento de ADN y técnicas de matrices de ácido nucleico. (Véase, por ejemplo, Breslin et al. (2006) Clin Am Soc Nephrol 1:88-99 y Goicoechea de Jorge et al. (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:240-245).

Los métodos para diagnosticar un sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, RA también se conocen en la técnica de la medicina. Por ejemplo, un practicante médico puede examinar las articulaciones pequeñas de las manos, muñecas, pies, y rodillas para identificar la inflamación en una distribución simétrica. El practicante también puede desarrollar una serie de pruebas para excluir otros tipos de inflamación de articulación que incluyen artritis debido a infección o gota. Adicionalmente, la artritis reumatoide se asocia con anticuerpos anormales en la circulación de la sangre de pacientes afligidos. Por ejemplo, un anticuerpo denominado como "factor reumatoide" se encuentra en aproximadamente 80% de los pacientes. En otro ejemplo, el anticuerpo anti-citrullina está presente en muchos pacientes con artritis reumatoide y así es útil en el diagnóstico de artritis reumatoide cuando se evalúan pacientes con inflamación de articulación no explicada. Véase, por ejemplo, van Venrooij et al. (2008) Ann NY Acad Sci 1143:268-285 y Habib et al. (2007) Immunol Invest 37(8): 849-857. Otro anticuerpo denominado "el anticuerpo antinuclear" (ANA) también se

encuentra frecuentemente en pacientes con artritis reumatoide. Véase, por ejemplo, Benucci et al. (2008) Clin Rheumatol 27(1): 91-95; Julkunen et al. (2005) Scan J Rheumatol 34(2): 122- 124; y Miyawaki et al. (2005) J Rheumatol 32(8): 1488-1494.

5

Un practicante médico también puede examinar el índice de sedimentación de glóbulos rojos para ayudar a diagnosticar RA en un sujeto. El índice de sedimentación se puede utilizar como una medida cruda de la inflamación de las articulaciones y es usualmente más rápido durante brotes de la enfermedad y disminuye durante las remisiones. Otra prueba de sangre que se puede utilizar para medir el grado de inflamación presente en el cuerpo es la proteína reactiva C.

10

Adicionalmente, también se pueden utilizar rayos x de articulación para diagnosticar un sujeto que tiene artritis reumatoide. Cuando evoluciona el RA, los rayos x pueden mostrar erosiones óseas típicas de artritis reumatoide en las articulaciones. Los rayos x de articulación también pueden ser útiles en la supervisión de la evolución de la enfermedad y daño de articulación con el tiempo. La exploración ósea, un procedimiento de prueba radioactivo, puede demostrar las articulaciones inflamadas.

15

20

Los métodos para identificar un sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, HELLP se conocen en la técnica de la medicina. Los síntomas característicos del síndrome HELLP incluyen hemólisis, enzimas de hígado elevadas, y conteo bajo de plaquetas. Sin embargo, se puede realizar una variedad de pruebas en la sangre de un sujeto para determinar el nivel de hemólisis, la concentración de cualquiera de una variedad de enzimas de hígado, y el nivel de plaqueta en la sangre. Por ejemplo, la presencia de esquistocitos y/o hemoglobina libre elevada, bilirrubina, o niveles de LDH en suero es una indicación de hemólisis intravascular. La prueba de laboratorio de rutina se puede utilizar para determinar el conteo de plaquetas así como también el nivel de sangre de las enzimas del hígado tal como, pero no limitado a, aminotransferasa de aspartato (AST) y transaminasa de alanina (ALT). Los métodos adecuados para identificar un sujeto que tiene síndrome HELLP también se describen en, por ejemplo, Sibai et al. (1993), supra; Martin et al. (1990), supra; Padden (1999), supra; y Gleicher and Buttino (1998) "Principles & Practice of Medical Therapy in Pregnancy," 3rd Edition, Appleton & Lange (ISBN 083857677X).

25

30

35

Los métodos para identificar un sujeto como que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar PNH se conocen en la técnica de la medicina. La evaluación de laboratorio de hemólisis normalmente incluye pruebas hematológicas, serológicas, y orina. Las pruebas hematológicas incluyen un examen del frotis de sangre para anomalías morfológicas de glóbulos rojos (RBC), y la medición del conteo de reticulocitos en sangre completa (para

40

determinar la compensación de médula ósea para pérdida de RBC). Las pruebas serológicas incluyen deshidrogenasa lactato (LDH; ampliamente realizado), y hemoglobina libre (no ampliamente realizado) como una medición directa de hemólisis. Los niveles de LDH, en la ausencia de daño de tejido en otros órganos, pueden ser útiles en el diagnóstico y supervisión de pacientes con hemólisis. Otras pruebas serológicas incluyen bilirrubina o haptoglobina, como medidas de productos de degradación o reserva de eliminación, respectivamente. Las pruebas de orina incluyen bilirrubina, hemosiderina, y hemoglobina libre, y se utilizan de manera general para medir la severidad de hemólisis y para la diferenciación de etiologías intravasculares vs. extravasculares de hemólisis a diferencia de supervisión de rutina de hemólisis. Adicionalmente, números de RBC, hemoglobina RBC, y hematocrito se realizan de manera general para determinar el grado de cualquier anemia que acompaña.

Los métodos adecuados para identificar el sujeto que tiene MG pueden ser cualitativos o cuantitativos. Por ejemplo, un médico practicante puede examinar el estado de las funciones motoras de un sujeto utilizando un examen físico. Otras pruebas cualitativas incluyen, por ejemplo, una prueba de empaque en hielo, en donde se aplica un empaque de hielo al ojo del sujeto (en caso de MG ocular) para determinar si uno o más síntomas (por ejemplo, tósis) se mejoran mediante el frío (véase, por ejemplo, Sethi et al. (1987) *Neurology* 37(8):1383-1385). Otras pruebas incluyen, por ejemplo, la "prueba del sueño," que se basa en la tendencia de síntomas MG para mejorar luego de descanso. En algunas realizaciones, se pueden emplear pruebas cuantitativas o semi-cuantitativas por un médico practicante para determinar si un sujeto tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, MG. Por ejemplo, un médico practicante puede realizar una prueba para detectar la presencia o cantidad de auto-anticuerpos asociados con MG en una muestra de suero obtenida de un sujeto. Los auto-anticuerpos asociados con MG incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen al, y modulan la actividad del receptor acetilcolina (AChR), el receptor de tirosina quinasa específico de músculo (MuSK), y/o la proteína de músculo estriado. (Véase, por ejemplo, Conti-Fine et al. (2006), *supra*). Los ensayos adecuados útiles para detectar la presencia o cantidad de un anticuerpo asociado con MG en una muestra biológica se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Hoch et al. (2001) *Nat Med* 7:365-368; Vincent et al. (2004) *Semin Neurol* 24: 125-133; McConville et al. (2004) *Ann Neurol* 55:580-584; Boneva et al. (2006) *J Neuroimmunol* 177: 119-131; y Romi et al. (2005) *Arch Neurol* 62; 442-446.

Los métodos adicionales para diagnosticar MG incluyen, por ejemplo, pruebas de electrodiagnóstico (por ejemplo, electromiografía de fibra sencilla) y la prueba de Tensilon (o edrofonio), que implica inyectar un sujeto con el edrofonio de inhibidor de acetilcolinesterasa y supervisar el sujeto para una mejora en uno o más síntomas. Véase, por ejemplo, Pascuzzi (2003) *Semin Neurol* 23(1): 83-88;

Katirji et al. (2002) *Neurol Clin* 20:557-586; y "Guidelines in Electrodiagnostic Medicine. American Association of Electrodiagnostic Medicine," *Muscle Nerve* 15: 229-253.

5 Se puede identificar un sujeto que tiene CAD utilizando un ensayo para detectar la presencia o cantidad (título) de autoanticuerpos de aglutinación que se unen al antígeno I en glóbulos rojos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales (por ejemplo, IgM o IgA monoclonal) o policlonales. Los métodos adecuados para detectar estos anticuerpos se describen en, por ejemplo, Christenson and Dacie
10 (1957) *Br J Haematol* 3: 153-164 y Christenson et al. (1957) *Br J Haematol* 3: 262-275. Un sujeto también se puede diagnosticar que tiene CAD utilizando uno o más de un conteo de glóbulos completo (CBC), uroanálisis, estudios bioquímicos, y una prueba de Coombs para probar hemólisis en sangre. Por ejemplo, los estudios bioquímicos se pueden utilizar para detectar los niveles de deshidrogenasa de lactasa elevada, niveles de bilirrubina no conjugada elevada, niveles bajos de haptoglobina, y/o la presencia de hemoglobina en plasma libre, todos los cuales pueden ser indicadores de hemólisis aguda. Otras pruebas que se pueden utilizar para detectar CAD incluyen detectar los niveles complementos en el suero. Por ejemplo, debido al consumo durante la fase aguda de hemólisis, niveles de
15 complemento de plasma medidos (por ejemplo, C2, C3, y C4) se reducen en CAD.
20

El HUS típico (o infeccioso), a diferencia del aHUS, es frecuentemente identificable mediante un prodromo de diarrea, frecuentemente con sangre en la naturaleza, lo que resulta de la infección con un microorganismo que produce la
25 toxina shiga. Se puede identificar un sujeto que tiene el HUS típico cuando las toxinas shiga y/o los anticuerpos en suero contra la toxina shiga o LPS se detectan en las heces de un individuo. Los métodos adecuados para probar los anticuerpos de toxina anti-shiga o LPS se conocen en la técnica. Por ejemplo, los métodos para detectar los anticuerpos que se unen a las toxinas shiga Stx1 y Stx2 o LPS en humanos se describen en, por ejemplo, Ludwig et al. (2001) *J Clin Microbiol*
30 39(6):2272-2279.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión a C5 descrito aquí se puede administrar a un sujeto como una monoterapia. Alternativamente, como se
35 describió anteriormente, el anticuerpo se puede administrar a un sujeto como una terapia de combinación con otro tratamiento, por ejemplo, otro tratamiento para DDD, TTP, AMD húmedo o seco, aHUS, PNH, RA, HELLP, MG, CAD, CAPS, sin embargo, asma, COPD, o cualquier otro trastorno asociado con complemento se conocen en la técnica o se describen aquí. Por ejemplo, la terapia de combinación
40 puede incluir administrar al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) uno o más agentes adicionales (por ejemplo, anti-coagulantes, anti-hipertensivos, o corticosteroides) que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto quien tiene, o está en riesgo de desarrollar, DDD. En algunas realizaciones, la terapia de

combinación puede incluir administrar al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) un polipéptido de unión a C5 y un agente inmunosupresor tal como Remicade® para uso en tratar RA. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a C5 y uno o más agentes activos adicionales se administran al mismo tiempo. En otras realizaciones, un polipéptido de unión a C5 se administra primero en el tiempo y uno o más agentes activos adicionales se administran por segunda vez en el tiempo. En algunas realizaciones, uno o más agentes activos adicionales se administran primero en el tiempo y el polipéptido de unión a C5 se administra por segunda vez en el tiempo.

Un polipéptido de unión a C5 descrito aquí puede reemplazar o aumentar una terapia previamente o actualmente administrada. Por ejemplo, luego de tratamiento con un polipéptido de unión a C5, la administración de uno o más agentes activos adicionales que puede cesar o disminuir, por ejemplo, se administra a niveles bajos. En algunas realizaciones, se puede mantener la administración de la terapia previa. En algunas realizaciones, se mantendrá una terapia previa hasta que el nivel del polipéptido de unión a C5 alcanza un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Las dos terapias se pueden administrar en combinación.

Supervisar un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para una mejora en un trastorno asociado con complemento, como se define aquí, significa evaluar el sujeto para un cambio en un parámetro de la enfermedad, por ejemplo, una mejora en uno o más los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, una mejora en uno o más los síntomas de una enfermedad pulmonar). Dichos síntomas incluyen cualquiera de los síntomas de trastornos asociados con complemento que se conocen en la técnica y/o se describen aquí. En algunas realizaciones, la evaluación se realiza por lo menos 1 hora, por ejemplo, por lo menos 2, 4, 6, 8, 12, 24, o 48 horas, o por lo menos 1 día, 2 días, 4 días, 10 días, 13 días, 20 días o más, o por lo menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas o más, después de una administración. El sujeto se puede evaluar en uno o más de los siguientes periodos: antes del inicio del tratamiento; durante el tratamiento; o después de uno o más elementos del tratamiento se han administrado. La evaluación puede incluir evaluar la necesidad de tratamiento adicional, por ejemplo, evaluar si se debe alterar una dosificación, frecuencia de administración, o duración de tratamiento. También puede incluir evaluar la necesidad de agregar o eliminar una modalidad terapéutica seleccionada, por ejemplo, agregar o eliminar cualquiera de los tratamientos para cualquiera de los trastornos asociados con complemento descritos aquí.

Métodos ex vivo. Una estrategia ex vivo para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento (por ejemplo, un trastorno asociado con AP o un trastorno asociado con CP) puede implicar transfectar o transducir una o más

células obtenidos de un sujeto con un polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a C5 descrito aquí.

Las células transfectadas o transducidas luego se regresan al sujeto. La
 5 célula puede ser cualquiera de un amplio rango de tipos que incluyen, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células T, o células B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, o células de músculo. Dichas células pueden actuar como una fuente (por ejemplo, fuente sostenida o
 10 periódica) del polipéptido de unión a C5 durante el tiempo que sobrevivan en el sujeto. En algunas realizaciones, los vectores y/o células se pueden configurar para expresión inducible o represable de polipéptido de unión a C5 (véase, por ejemplo, Schockett et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93: 5173-5176 y Patente Estadounidense No. 7,056,897).

15 Preferiblemente, las células se obtienen del sujeto (autólogas), pero se pueden obtener potencialmente de un sujeto de la misma especie diferente al sujeto (alogénico).

20 Los métodos adecuados para obtener las células de un sujeto y transducir o transfectar las células se conocen en la técnica de la biología molecular. Por ejemplo, la etapa de transducción se puede llevar a cabo mediante cualesquier medios estándar utilizados para terapia de gen ex vivo, que incluye fosfato de calcio, lipofección, electroporación, infección vírica (ver anterior), y transferencia
 25 de gen biolístico. (Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (supra) y Ausubel et al. (1992) "Current Protocols in Molecular Biology," Greene Publishing Associates).

Alternativamente, se pueden utilizar liposomas o micropartículas poliméricas. Las células que se han transducido exitosamente se pueden
 30 seleccionar, por ejemplo, para la expresión de la secuencia codificante de un gen de resistencia de fármaco.

Equipos terapéuticos

35 La descripción también caracteriza equipos terapéuticos y diagnósticos que contienen, entre otras cosas, uno o más de los polipéptidos de unión a C5 descritos aquí. Los equipos terapéuticos pueden contener, por ejemplo, medios adecuados para el suministro de uno o más polipéptidos de unión a C5 a un sujeto. En algunas realizaciones, el medio es adecuado para suministro
 40 subcutáneo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para el sujeto. El medio puede ser, por ejemplo, una jeringa o una bomba osmótica.

En algunas realizaciones, el medio es adecuado para suministro intrapulmonar de un polipéptido de unión a C5 a un sujeto, por ejemplo, para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno pulmonar asociado con complemento tal como, pero no limitado a, COPD o asma. De acuerdo con lo anterior, el medio puede ser, por ejemplo, un inhalador oral o nasal (ver anterior).

El inhalador puede ser, por ejemplo, un inhalador de dosis medida (MDI), inhalador de polvo seco (DPI), o un nebulizador. Dicho equipo también, opcionalmente, puede incluir instrucciones para administrar (por ejemplo, auto-administración de) el polipéptido de unión a C5 a un sujeto.

Los equipos terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, uno o más agentes activos adicionales para tratar o evitar un trastorno asociado con complemento y/o aliviar un síntoma del mismo. Por ejemplo, los equipos terapéuticos diseñados para uso en tratar o evitar un trastorno pulmonar asociado con complemento puede incluir uno o más agentes activos adicionales que incluyen, pero no se limitan a, otro anticuerpo terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE, un anticuerpo anti-IL-4, o un anticuerpo anti-IL-5), un inhibidor anti-IgE de molécula pequeña (por ejemplo, montelukast sodio), un simpatomimético (por ejemplo, albuterol), un antibiótico (por ejemplo, tobramicina), una desoxiribonucleasa (por ejemplo, pulmozima), un fármaco anticolinérgico (por ejemplo, bromuro de ipratropio), un corticosteroide (por ejemplo, dexametasona), un agonista β -adrenoreceptor, un inhibidor leucotrieno (por ejemplo, zileuton), un inhibidor de 5-lipoxigenasa, un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE), un antagonista CD23, un antagonista IL-13, un inhibidor de liberación de citoquina, un antagonista del receptor de histamina H1, una anti-histamina, un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, cromolin sodio o cualquier otro agente anti-inflamatorio se conocen en la técnica o se describen aquí), o un inhibidor de liberación de histamina.

En algunas realizaciones, el medio puede ser adecuado para la administración de un polipéptido de unión a C5 descrito aquí en el ojo de un sujeto en necesidad del mismo, por ejemplo, un sujeto afligido con AMD. El medio puede ser, por ejemplo, una jeringa, un parche trans-esclerótico, o incluso un lente de contacto que contiene el polipéptido. El medio, en algunas realizaciones, puede ser un gotero ocular, en donde el polipéptido de unión a C5 se formula para dicha administración. El medio también puede ser, por ejemplo, un lente de contacto en realizaciones en las que, por ejemplo, el polipéptido de unión a C5 se formula como parte de una solución para hidratar, limpiar, o enjuagar un lente de contacto. Dichos equipos terapéuticos también pueden incluir, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos adicionales para uso en tratar un trastorno ocular asociado con complemento. Los agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, bevacizumab o el fragmento Fab de bevacizumab, ranibizumab, ambos vendidos por Roche Pharmaceuticals, Inc., pegaptanib sodio (Mucogen®; Pfizer, Inc.), y

verteporfm (Visudyne®; Novartis). Dicho equipo también, opcionalmente, puede incluir instrucciones para administrar el polipéptido de unión a C5 a un sujeto.

En algunas realizaciones, el medio puede ser adecuado para administración intraarticular de un polipéptido de unión a C5 descrito aquí a un sujeto en necesidad del mismo, por ejemplo, un sujeto afligido con RA. El medio puede ser, por ejemplo, una jeringa o una jeringa de dos cañones. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,065,645 y 6,698,622. Una jeringa de dos cañones es útil para administrar a una articulación dos composiciones diferentes con solo una inyección. Se pueden incorporar dos jeringas separadas para uso en la administración del agente terapéutico mientras se extrae fluido de la rodilla para análisis (tapping) en una forma de vaivén. Los agentes terapéuticos adicionales que se pueden administrar con el polipéptido de unión a C5 en conjunto con la jeringa de dos cañones, o que de otra forma se puede incluir de manera general en los equipos terapéuticos descritos aquí, incluyen, por ejemplo, NSAID, corticosteroides, metotrexato, hidroxiclороquina, agentes anti-TNF tal como etanercept y infliximab, un agente de agotamiento de célula B tal como rituximab, un antagonista de interleuquina-1, o un agente de bloqueo coestimulador de célula T tal como abatacept. Dicho equipo también, opcionalmente, puede incluir instrucciones para administrar un polipéptido de unión a C5 a un sujeto.

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

Ejemplo 1. La Sustitución R38Q No Afecta Significativamente la Unión a C5

Las cinéticas de unión entre el componente de complemento C5 y pexelizumab (discutido supra) o una variante de pexelizumab se estudian utilizando el sistema Biacore™ 3000 (Biacore, GE Healthcare). La variante pexelizumab comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWYQQKPGKAPKLLIYGATN
LADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLTPLTFGQGGTKVEIK
RTGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVK PGASVKVSCKASGYIFSNIYWI
QWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSS
LRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 2). La
secuencia de aminoácidos de la variante difiere de la secuencia de aminoácidos de pexelizumab mediante dos aminoácidos. Primero, el anticuerpo de cadena sencilla variante no contiene una alanina de terminal amino que está presente en pexelizumab. El anticuerpo variante también contiene una sustitución de la arginina (R) en la posición 38 de pexelizumab para glutamina (Q) (en negrilla anterior). Adelante, el anticuerpo de cadena sencilla variante se denomina como "R38Q scFv."

La proteína C5 humana se obtiene de Advanced Research Technologies (catálogo no. A120; Montreal, Quebec, Canadá). Se prepara R38Q scFv en una solución de 1.9 mg/mL que contiene 0.01% de Tween-80. Las cinéticas de unión entre R38Q scFv y C5 se miden al inmovilizar directamente el anticuerpo a un chip sensor CM5 (Biacore, GE Healthcare). Todas las mediciones se realizan a una temperatura de superficie de sensor 25° C.

Se pasan diversas concentraciones de C5 sobre la superficie de chip que contiene el R38Q scFv unido. Las concentraciones de 0.1875 nM a 24 nM C5 se evalúan con un tiempo de disociación de 1,500 segundos. Las cinéticas de unión entre R38Q scFv y C5 se determinan utilizando un modelo 1: 1 Langmuir (los datos cinéticos se establecen en la Tabla 1). Después de ajustar los datos al modelo Langmuir, el K_D de la interacción entre R38Q scFv y C5 se determina por ser 108 pM. Bajo condiciones similares, el K_D de la interacción entre pexelizumab y C5 se determina que es 390 pM. Estos datos indican que la sustitución R38Q no afecta significativamente la capacidad del anticuerpo R38Q scFv para unirse a C5.

Tabla 1

Experimento	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (S^{-1})	K_D (M)	Residuos	χ^2
R38Q scFv y C5	5.59e5	6.06e-5	1.08e-10	±2.0	0.227
Auto asociación de R38Q scFv	334	0.0107	3.2e-5	±3.5	0.621

La auto-asociación del R38Q scFv también se evalúa utilizando Biacore. En resumen, R38Q scFv se inmoviliza directamente en el chip sensor CM5 y diversas concentraciones (0.6 -75 μ M) de R38Q scFv se pasan sobre la superficie del chip.

Aunque los datos obtenidos en los datos de auto-asociación no ajustan el modelo Langmuir per se (χ^2 de 0.621 y residuos de $\pm$ 3.5), el K_D se determina que es 32 μ M, que es comparable con estudios previos con pexelizumab bajo condiciones similares.

Ejemplo 2. La Sustitución de R38Q No Afecta Significativamente la Inhibición de Hemólisis

Pexelizumab es un inhibidor potente de hemólisis in vitro. Para determinar si la sustitución R38Q afecta la capacidad del anticuerpo R38Q scFv para inhibir

hemólisis, el anticuerpo se evalúa en un ensayo de hemólisis de glóbulos rojos in vitro.

El ensayo de hemólisis de glóbulos rojos se describe de manera general en detalle en, por ejemplo, Rinder et al. (1995) J Clin Invest 96: 1564-1572. En resumen, se agrega suero humano normal a múltiples pozos de una placa de ensayo de 96 pozos de tal manera que la concentración del suero en cada pozo es aproximadamente 10%. Se agregan diferentes concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1, y 0.5 µg/mL) de pexelizumab o el anticuerpo sustituido R38Q a pozos que contienen suero. Algunos de los pozos que contienen suero no contienen el anticuerpo y sirven como controles negativos.

Se lavan eritrocitos de pollo (Lampire Biological Laboratories, Piperville, PA) y se resuspenden en regulador a una concentración final de 5×10^7 células/mL. Los eritrocitos se sensibilizan para lisis al incubar las células con una composición de anticuerpo policlonal de glóbulos rojos anti-pollo. Los eritrocitos sensibilizados se agregan a los pozos de la placa de 96 pozos y la placa se incuba a 37° C durante 30 minutos. Se mide la liberación de hemoglobina mediante absorbancia evidente a 415 nm utilizando un lector de microplaca.

Como se muestra en la Figura 1, pexelizumab y el anticuerpo sustituido R38Q inhibe la hemólisis de eritrocito, cada uno tiene un IC_{50} de aproximadamente 2 µg/mL. Estos resultados indican que la sustitución R38Q no afecta la capacidad del R38Q scFv para inhibir hemólisis in vitro.

Ejemplo 3. R38Q scFv Exhibe Solubilidad Mejorada cuando se Compara con Pexelizumab

Se evalúa la solubilidad de R38Q scFv. Se agregan diferentes cantidades de R38Q scFv a una solución regulada con fosfato (10 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7). Las soluciones de R38Q scFv de hasta 50 mg/mL se pueden preparar en el regulador. En contraste, el límite de solubilidad de pexelizumab en el mismo regulador es aproximadamente 2 mg/mL. Estos resultados indican que la sustitución de R38Q aumenta la solubilidad del anticuerpo variante en la solución acuosa.

Ejemplo 4. R38Q scFv Oligomeriza Reversiblemente en la Solución a Alta Concentración

La oligomerización de la proteína es un factor de riesgo significativo para soluciones de alta concentración de la proteínas (por ejemplo, anticuerpos) y la oligomerización puede afectar la actividad de una proteína biológicamente activa. Véase, por ejemplo, Treuheit et al. (2002) Pharm Res 19(4): 511-516 y Shire et al.

(2004) J Pharm Sci 93: 1390-1402. Para caracterizar el grado de oligomerización (Si en lo absoluto) de R38Q scFv en la solución en altas concentraciones, se preparan diversas soluciones (1.9 mg/mL, 10 mg/mL, y 50 mg/mL) del anticuerpo en regulador de fosfato (10 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7).

5 El estado de oligomerización de R38Q scFv en la solución se analiza al someter 20 µg de la proteína de cada solución para cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Los resultados de los experimentos se resumen en la Tabla 2. (La forma dimérica de R38Q scFv es la forma dominante del anticuerpo en la solución). Estos resultados indican que

10 R38Q scFv forma especies oligoméricas en la solución y que el porcentaje de especies oligoméricas en la solución aumenta con la concentración.

Tabla 2.

% de Forma Oligomérica*								
Muestra	Monómero	Dímero	Trímero	Tetrámero	Pentámero	Hexámero	Heptámero	Octámero
1.9 mg/mL	4.82	77.28	13.09	2.94	0.89	ND	ND	ND
10 mg/mL	2.59	61.46	19.89	8.54	3.99	3.53	ND	ND
**50 mg/mL	1.32	30.02	15.27	9.94	7.38	5.92	4.81	3.84

*El porcentaje de cada forma de R38Q scFv se calcula como el porcentaje de área.

15 **La solución de 50 mg/mL también contiene aproximadamente 21.5% de oligómeros de mayor orden.

ND significa "no detectado."

20 Para determinar si la oligomerización dependiente de concentración de R38Q scFv en la solución es reversible, se realiza el siguiente experimento. Primero, se prepara una solución de 50 mg/mL de R38Q scFv en el siguiente regulador: 10 mM fosfato de sodio pH 7, 150 mM cloruro de sodio, y 0.01% de Tween 20. Luego se diluye la solución de 50 mg/mL a 2 mg/mL y se incuba

25 durante varios momentos (108, 1100, 5762 minutos) a 4-5° C antes de someter 20 µg de la muestra de 2 mg/mL a SEC HPLC. Los resultados del experimento se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3.

% de Forma Oligomérica*									
Tiempo a 3 mg/mL (min)	Monómero	Dímero	Trímero	Tetrámero	Pentámero	Hexámero	Heptámero	Octámero	Orden mayor

0	1.15	30.57	15.44	9.81	7.54	5.83	4.70	4.04	20.93
108	3.95	35.34	19.93	13.99	10.35	7.65	8.72	ND	ND
1100	5.59	51.29	25.68	11.45	4.30	1.61	ND	ND	ND
5762	4.65	73.53	16.68	3.84	1.22	ND	ND	ND	ND

*El porcentaje de cada forma de R38Q scFv se calcula como el porcentaje de área.

ND significa "no detectado."

5 Luego de dilución y durante el tiempo, las formas oligoméricas de orden mayor de R38Q scFv detectadas en la solución de 50 mg/mL se disocian en especies de orden menor. Por ejemplo, después de 5,762 minutos, no se detectan especies de orden hexamérico, heptamérico, octomérico, o mayor en la solución de 2 mg/mL diluida. De hecho, el porcentaje de la forma dimérica, dominante 5762 minutos después de diluir a una solución de 2 mg/mL (73.53%) tiene aproximadamente la misma cantidad que está presente en la solución no diluida de 1.9 mg/mL analizada anteriormente (77.28%; ver Tabla 2). Estos resultados indican que la oligomerización dependiente de concentración de R38Q scFv en la solución es reversible. Los resultados también indican que las formas oligoméricas de mayor orden y multiméricas de R38Q scFv presentes en una solución de alta concentración, cuando se diluye antes de administración o cuando se diluye luego de administración a un sujeto, probablemente se disocian en la forma dimérica predominante.

20 Ejemplo 5. Formulación de R38Q scFv de Alta Concentración No Afecta Significativamente la Actividad del Anticuerpo

25 Como se anotó anteriormente, la oligomerización de las proteínas biológicamente activas puede, en algunos casos, afectar la actividad biológica de la proteína. Para determinar si la oligomerización reversible de R38Q scFv afecta su actividad biológica, se preparan diversas soluciones (1.9 mg/mL, 10 mg/mL, y 50 mg/mL) del anticuerpo en regulador de fosfato (10 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7) como se describió anteriormente y se evalúan en un ensayo de hemólisis in vitro (ver anteriormente).

30 Se agrega suero humano normal a múltiples pozos de una placa de ensayo de 96 pozos. La proteína R38Q scFv de la solución de 50 mg/mL se agrega a un conjunto de pozos que contienen suero en una cantidad de tal manera que la concentración final del anticuerpo en el pozo es 10, 5, 2.5, 1.25, 0.75, 0.375, o 35 0.188 µg/mL, respectivamente. La proteína de anticuerpo R38Q scFv de las soluciones de 10 mg/mL y 1.9 mg/mL también se agrega a conjuntos paralelos de pozos que contienen suero en cantidades suficientes para lograr las mismas

concentraciones finales del anticuerpo en los pozos. Algunos de los pozos que contienen suero no contienen al anticuerpo y sirven como controles negativos.

5 Luego se agregan eritrocitos sensibilizados a los pozos de la placa de 96 pozos y la placa se incuba a 37° C durante 30 minutos. Se mide la liberación de hemoglobina mediante absorbancia evidente a 415 nm utilizando un lector de microplaca.

10 Como se muestra en la Figura 2, la oligomerización dependiente de concentración reversible de la proteína R38Q scFv no afecta significativamente la capacidad del anticuerpo para inhibir la hemólisis in vitro de glóbulos rojos de pollo. Estos resultados indican que la proteína R38Q scFv presente en formas oligoméricas de mayor orden y multiméricas en soluciones de mayor concentración retiene la actividad biológica. Los resultados también indican que
15 cuando se diluye antes de administración o cuando se diluye luego de administración a un sujeto, la proteína R38Q scFv presente en soluciones de alta concentración es competente para inhibir terapéuticamente la hemólisis en el sujeto.

20 Aunque la presente descripción se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, cabe entender por aquellos expertos en la técnica que se pueden hacer diversos cambios y se pueden sustituir los equivalentes sin apartarse del espíritu verdadero y alcance de la descripción. Adicionalmente, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una
25 situación particular, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de proceso, para el objetivo, espíritu y alcance de la presente descripción. Todas dichas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de la descripción.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

- 5 1. Un polipéptido que comprende: (i) aminoácidos 1-107 descrita en la SEQ ID NO: 2 y (ii) aminoácidos 125-246 descrita en la SEQ ID NO: 2, con la condición que el polipéptido no es un anticuerpo completo.

- 10 2. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos que comprende: (i) aminoácidos 1-107 descrita en la SEQ ID NO: 2 y (ii) aminoácidos 125-246 descrita en la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido se une al componente de complemento humano C5 y la secuencia de aminoácidos del polipéptido comprende el residuo de glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2, con la condición que el polipéptido no es un anticuerpo completo.

- 15 3. Un polipéptido que comprende: (i) aminoácidos 1-107 descrita en la SEQ ID NO: 2 y (ii) aminoácidos 125-246 descrita en la SEQ ID NO: 2 con no más de 10 sustituciones de aminoácidos en (i) o (ii), en donde el polipéptido se une al componente de complemento humano C5 y la secuencia de aminoácidos comprende el residuo de glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2, con la condición que el polipéptido no es un anticuerpo completo.

- 20 4. Un polipéptido que comprende por lo menos 50 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido se une al componente de complemento humano C5 y por lo menos 50 aminoácidos comprenden el residuo de glutamina en la posición 38 de la SEQ ID NO: 2, con la condición que el polipéptido no es un anticuerpo completo.

- 25 5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2.

- 30 6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido consiste de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2.

- 35 7. Un polipéptido de fusión que comprende:
 - 40 (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 - (b) una secuencia de aminoácidos que es heteróloga a los aminoácidos 1-107 y 125-246 de la SEQ ID NO: 2.

8. El polipéptido de fusión de la reivindicación 7, en donde el polipéptido de fusión es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 5 9. Un polipéptido de fusión que comprende:
 - (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 - (b) una unidad estructural objetivo que dirige el polipéptido de (a) a un sitio de activación de complemento.
- 10 10. El polipéptido de fusión de la reivindicación 9, en donde la unidad estructural objetivo comprende una forma soluble del receptor de complemento 1 o una forma soluble del receptor de complemento 2.
- 15 11. El polipéptido de fusión de la reivindicación 9, en donde la unidad estructural objetivo comprende un anticuerpo que se une al componente de complemento C3b o componente de complemento C3d.
- 20 12. El polipéptido de fusión de la reivindicación 9, en donde la unidad estructural objetivo comprende un anticuerpo que se une a un antígeno específico de tejido.
- 25 13. El polipéptido de fusión de la reivindicación 12, en donde el tejido es tejido de riñón.
- 30 14. El polipéptido de fusión de la reivindicación 13, en donde la unidad estructural objetivo comprende un anticuerpo que se une al KIM-1 humano.
- 35 15. Un ácido nucleico que codifica el (a) polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o (b) el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14.
- 40 16. El ácido nucleico de la reivindicación 15, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 1.
17. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15 o 16.
18. El vector de la reivindicación 17, en donde el ácido nucleico se une operablemente a una secuencia de control de expresión.
19. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 17 o 18.

20. La célula de la reivindicación 19, en donde la célula es una célula bacteriana.
- 5 21. La célula de la reivindicación 19, en donde la célula es una célula de mamífero.
22. La célula de la reivindicación 21, en donde la célula de mamífero es una célula humana o una célula de roedor.
- 10 23. Un método para producir un polipéptido, el método comprende cultivar la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido o polipéptido de fusión.
- 15 24. El método de la reivindicación 23, que comprende adicionalmente aislar el polipéptido o polipéptido de fusión de la célula o del medio en que se cultiva.
- 20 25. Un polipéptido o polipéptido de fusión producido a partir del método de la reivindicación 23 o 24.
- 25 26. Una composición farmacéutica que comprende:
el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25, o el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 o 25;
y
un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 27. Una solución farmacéutica que comprende (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25, o (b) el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 o 25, en donde el polipéptido o polipéptido de fusión está presente en la solución en una concentración de entre 5 mg/mL a 100 mg/mL.
- 35 28. La solución farmacéutica de la reivindicación 27, en donde la concentración del polipéptido o el polipéptido de fusión en la solución es por lo menos 10 mg/mL, pero menos de o igual a 100 mg/mL.
- 40 29. La solución farmacéutica de la reivindicación 27, en donde la concentración del polipéptido o el polipéptido de fusión en la solución es por lo menos 10 mg/mL, pero menos de o igual a 50 mg/mL.

30. La solución farmacéutica de la reivindicación 27, en donde la concentración del polipéptido o el polipéptido de fusión en la solución es por lo menos 20 mg/mL, pero menos de o igual a 50 mg/mL.
- 5 31. La solución farmacéutica de la reivindicación 27, en donde la concentración del polipéptido o el polipéptido de fusión en la solución es por lo menos 5 mg/mL, pero menos de 30 mg/mL.
- 10 32. Un método para inhibir la formación de el complemento terminal en una muestra biológica, el método comprende poner en contacto una muestra biológica con un agente terapéutico en una cantidad efectiva para inhibir el complemento terminal en la muestra biológica, en donde la muestra biológica es capaz de la producción del complemento terminal en la ausencia del agente terapéutico y en donde el agente terapéutico es (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25, o (b) el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 o 25.
- 15 33. El método de la reivindicación 32, en donde la muestra biológica es una muestra de suero.
- 20 34. El método de la reivindicación 33, en donde la muestra de suero se obtiene de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con complemento.
- 25 35. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado con complemento, el método comprende administrar al sujeto que tiene un trastorno asociado con complemento un agente terapéutico en una cantidad efectiva para tratar el trastorno asociado con complemento, en donde el agente terapéutico es (a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25, o (b) el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 o 25.
- 30 36. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado con complemento, el método comprende administrar al sujeto que tiene un trastorno asociado con complemento una composición terapéutica en una cantidad efectiva para tratar el trastorno asociado con complemento, en donde la composición terapéutica es (a) la composición farmacéutica de la reivindicación 26 o (b) la solución farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31.
- 35 37. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde el trastorno asociado con complemento es hemoglobinuria nocturna paroxismal.
- 40

38. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde el trastorno asociado con complemento es síndrome urémico hemolítico atípico.
- 5 39. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde el trastorno asociado con complemento es degeneración macular relacionada con la edad.
40. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde el trastorno asociado con complemento es rechazo de injerto.
- 10 41. El método de la reivindicación 40, en donde el sujeto es uno que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, rechazo de médula ósea, rechazo de injerto de riñón, rechazo de injerto de piel, rechazo de injerto de corazón, rechazo de injerto de pulmón, o rechazo de injerto de hígado.
- 15 42. El método de la reivindicación 35 o 36, en donde el trastorno asociado con complemento se selecciona del grupo que consiste de artritis reumatoide, una afección pulmonar, lesión de isquemia-reperfusión, síndrome urémico hemolítico atípico, púrpura trombocitopénica trombótica, hemoglobinuria nocturna paroxismal, enfermedad de depósito denso, degeneración macular relacionada con la edad, pérdida fetal espontánea, vasculitis inmunológica de Pauci, epidermolisis ampollar, pérdida fetal recurrente, esclerosis múltiple, lesión traumática de cerebro, miastenia gravis, enfermedad por crioaglutininas, dermatomiositis, enfermedad de Degos, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, diabetes tipo I, soriasis, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Goodpasture, neuropatía motriz multifocal, neuromielitis óptica, síndrome de antifosfolípido, y síndrome de antifosfolípido catastrófico.
- 20 43. El método de la reivindicación 42, en donde la afección pulmonar se selecciona del grupo que consiste de trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), asma, fibrosis pulmonar, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterans, y sarcoidosis.
- 25 44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 43, en donde el polipéptido o polipéptido de fusión se administra intravenosamente al sujeto.
- 30 45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 43, en donde el polipéptido o polipéptido de fusión se administra a los pulmones del sujeto.
- 35 46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 43, en donde el polipéptido o polipéptido de fusión se administra subcutáneamente al sujeto.
- 40

47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 46, que comprende adicionalmente administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar un trastorno asociado con complemento.
- 5 48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 47, en donde el sujeto es un humano.
- 10 49. Un conjugado que comprende: (i) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25; y (ii) una unidad estructural heteróloga conjugada al polipéptido.
50. El conjugado de la reivindicación 49, en donde la unidad estructural heteróloga se conjuga covalentemente al polipéptido.
- 15 51. El conjugado de la reivindicación 49, en donde la unidad estructural heteróloga es el polipéptido no covalentemente conjugado.
- 20 52. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51, en donde la unidad estructural heteróloga es una etiqueta detectable.
53. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51, en donde la unidad estructural heteróloga es un primer miembro de un par de unión específico.
- 25 54. Un equipo para uso en tratar un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con complemento, el equipo comprende:
- 30 (i) un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de: (a) uno o más de los polipéptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 25, (b) el polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 o 25, (c) el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 53, (d) la composición farmacéutica de la reivindicación 26, y (e) la solución farmacéutica de
- 35 una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 ; y
- (ii) un medio para suministrar el agente terapéutico.
- 40 55. El equipo de la reivindicación 54, en donde el medio es adecuado para suministro subcutáneo del agente terapéutico al sujeto.
56. El equipo de la reivindicación 54, en donde el medio es adecuado para suministro intraocular del agente terapéutico al sujeto.

57. El equipo de la reivindicación 54, en donde el medio es adecuado para suministro intraarticular del agente terapéutico al sujeto.
- 5 58. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 54 a 57, en donde el medio es una jeringa.
59. El equipo de la reivindicación 57, en donde el medio es una jeringa de doble cañón.
- 10 60. El equipo de la reivindicación 56, en donde el medio es un parche trans-esclerótico o un lente de contacto que comprende el agente terapéutico.
61. El equipo de la reivindicación 54, en donde el medio es adecuado para suministro intrapulmonar del agente terapéutico al sujeto.
- 15 62. El equipo de la reivindicación 61, en donde el medio es un inhalador o un nebulizador.
- 20 63. El equipo de una cualquiera de las reivindicaciones 54 a 62, que comprende adicionalmente por lo menos un agente activo adicional para uso en tratar un trastorno asociado con complemento en un sujeto.

25

30 COLO 15212 841 003 1
Id. 240961

POLIPÉPTIDOS QUE SE UNEN AL COMPONENTE DE COMPLEMENTO
HUMANO C5

5

Resumen:

10 La presente descripción se relaciona con, inter alia, polipéptidos de unión a C5 y uso de los polipéptidos en métodos para tratar o evitar trastornos asociados con complemento. También se caracterizan equipos terapéuticos que contienen uno o más de los polipéptidos de unión a C5 y significa administrar los polipéptidos a un sujeto.

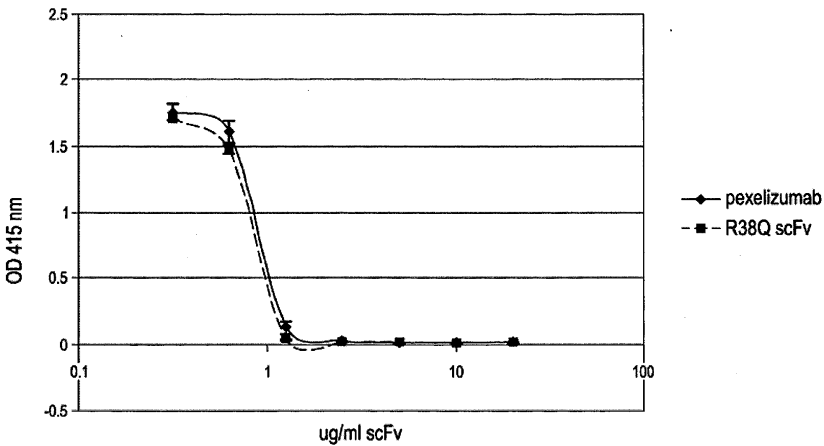


FIG. 1

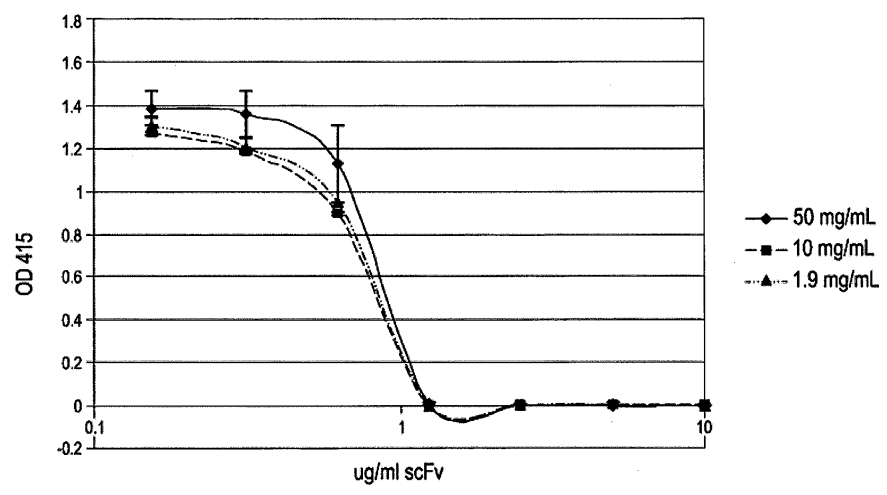


FIG. 2

86
85

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1
SEQUENCE LISTING

<110> David Gies, Jeffrey W. Hunter, and Jeremy P. Springhorn
<120> Polypeptides that Bind to Human Complement Component C5
<130> ALXN-156-001
<140>
<141> 2010-10-01
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 741
<212> DNA
<213> Nucleic acid sequence encoding a humanized single chain antibody that binds to complement component C5 and the translated amino acid sequence of the antibody

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(741)

<400> 1
gat atc cag atg acc cag tcc ccg tcc tcc ctg tcc gcc tct gtg ggc 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gat agg gtc acc atc acc tgc ggc gcc agc gaa aac atc tat ggc gcg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
20 25 30

ctg aac tgg tat caa cag aaa ccc ggg aaa gct ccg aag ctt ctg att 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tac ggt gcg acg aac ctg gca gat gga gtc cct tct cgc ttc tct gga 192
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

tcc ggc tcc gga acg gat ttc act ctg acc atc agc agt ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gac ttc gct acg tat tac tgt cag aac gtt tta aat act ccg ttg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
85 90 95

act ttc gga cag ggt acc aag gtg gaa ata aaa cgt act ggc ggt ggt 336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Gly Gly
100 105 110

ggg tct ggt ggc ggt gga tct ggt ggt ggc ggt tct caa gtc caa ctg 384
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
115 120 125

gtg caa tcc ggc gcc gag gtc aag aag cca ggg gcc tca gtc aaa gtg 432
Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
130 135 140

tcc tgt aaa gct agc ggc tat att ttt tct aat tat tgg att caa tgg 480
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln Trp
145 150 155 160

gtg cgt cag gcc ccc ggg cag ggc ctg gaa tgg atg ggt gag atc tta 528
Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Leu
165 170 175

ccg ggc tct ggt agc acc gaa tat acc gaa aat ttt aaa gac cgt gtt 576
Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe Lys Asp Arg Val
180 185 190

87
86

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1

```
act atg acg cgt gac act tcg act agt aca gta tac atg gag ctc tcc      624
Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser
      195                      200                      205

agc ctg cga tcg gag gac acg gcc gtc tat tat tgc gcg cgt tat ttt      672
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe
      210                      215                      220

ttt ggt tct agc ccg aat tgg tat ttt gat gtt tgg ggt caa gga acc      720
Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
      225                      230                      235                      240

ctg gtc act gtc tcg agc tga
Leu Val Thr Val Ser Ser
      245                      741
```

<210> 2
<211> 246
<212> PRT
<213> Amino acid sequence of a humanized single chain antibody that binds to complement component C5
<400> 2

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                      5                      10                      15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
      20                      25                      30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35                      40                      45

Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
      85                      90                      95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Gly Gly
      100                      105                      110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
      115                      120                      125

Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
      130                      135                      140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Gln Trp
      145                      150                      155                      160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Leu
      165                      170                      175

Pro Gly Ser Gly Ser Thr Glu Tyr Thr Glu Asn Phe Lys Asp Arg Val
      180                      185                      190

Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser
      195                      200                      205
```

88
87

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Phe
210 215 220

Phe Gly Ser Ser Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Exemplary linker amino acid sequence present in a variant pexelizumab
antibody

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 1676
<212> PRT
<213> Exemplary amino acid sequence of an immature human complement component C5
protein

<400> 4

Met Gly Leu Leu Gly Ile Leu Cys Phe Leu Ile Phe Leu Gly Lys Thr
1 5 10 15

Trp Gly Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg
20 25 30

Val Gly Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu
35 40 45

Ala Phe Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe
50 55 60

Ser Tyr Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln
65 70 75 80

Asn Ser Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln
85 90 95

Asn Pro Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser
100 105 110

Lys Ser Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile
115 120 125

89
88

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1

His Thr Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
405 410 415

Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1
420 425 430

Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
435 440 445

Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
450 455 460

Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
465 470 475 480

His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
485 490 495

Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
500 505 510

Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
515 520 525

Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
530 535 540

Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
545 550 555 560

Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
565 570 575

Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
580 585 590

Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
595 600 605

Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
610 615 620

Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
625 630 635 640

Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
645 650 655

Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
660 665 670

Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
675 680 685

Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
690 695 700

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
705 710 715 720

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
 725 730 735
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
 740 745 750
 His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
 755 760 765
 Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
 770 775 780
 Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
 785 790 795 800
 Gly Ile Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
 805 810 815
 Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
 820 825 830
 Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
 835 840 845
 Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
 850 855 860
 Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
 865 870 875 880
 Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
 885 890 895
 Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
 900 905 910
 Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
 915 920 925
 Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
 930 935 940
 Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
 945 950 955 960
 Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
 965 970 975
 Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
 980 985 990
 Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
 995 1000 1005
 Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His
 Página 6

92
91

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1
1010 1015 1020

Tyr	Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Ile	Phe	His	Ser	Asp	Pro
1025						1030					1035			
Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Gly	Met
1040						1045					1050			
Leu	Ser	Ile	Met	Ser	Tyr	Arg	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Val
1055						1060					1065			
Trp	Lys	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Ala	Leu
1070						1075					1080			
Arg	Val	Leu	Gly	Gln	Val	Asn	Lys	Tyr	Val	Glu	Gln	Asn	Gln	Asn
1085						1090					1095			
Ser	Ile	Cys	Asn	Ser	Leu	Leu	Trp	Leu	Val	Glu	Asn	Tyr	Gln	Leu
1100						1105					1110			
Asp	Asn	Gly	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Ser	Gln	Tyr	Gln	Pro	Ile	Lys
1115						1120					1125			
Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	Glu	Ala	Arg	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr
1130						1135					1140			
Leu	Thr	Ala	Phe	Thr	Val	Ile	Gly	Ile	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp	Ile
1145						1150					1155			
Cys	Pro	Leu	Val	Lys	Ile	Asp	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Ala	Asp	Asn
1160						1165					1170			
Phe	Leu	Leu	Glu	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Gln	Ser	Thr	Phe	Thr	Leu
1175						1180					1185			
Ala	Ile	Ser	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Pro
1190						1195					1200			
Gln	Phe	Arg	Ser	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg	Glu	Ala	Leu	Val
1205						1210					1215			
Lys	Gly	Asn	Pro	Pro	Ile	Tyr	Arg	Phe	Trp	Lys	Asp	Asn	Leu	Gln
1220						1225					1230			
His	Lys	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Asn	Thr	Gly	Thr	Ala	Arg	Met	Val
1235						1240					1245			
Glu	Thr	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn	Leu	Lys	Asp
1250						1255					1260			
Ile	Asn	Tyr	Val	Asn	Pro	Val	Ile	Lys	Trp	Leu	Ser	Glu	Glu	Gln
1265						1270					1275			
Arg	Tyr	Gly	Gly	Gly	Phe	Tyr	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	Ile	Asn	Ala
1280						1285					1290			

93
92

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1

Ile	Glu	Gly	Leu	Thr	Glu	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Lys	Gln	Leu	Arg
	1295					1300					1305			
Leu	Ser	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Tyr	Lys	His	Lys	Gly	Ala	Leu
	1310					1315					1320			
His	Asn	Tyr	Lys	Met	Thr	Asp	Lys	Asn	Phe	Leu	Gly	Arg	Pro	Val
	1325					1330					1335			
Glu	Val	Leu	Leu	Asn	Asp	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Thr	Gly	Phe	Gly
	1340					1345					1350			
Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Val	His	Val	Thr	Thr	Val	Val	His	Lys	Thr
	1355					1360					1365			
Ser	Thr	Ser	Glu	Glu	Val	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Lys	Ile	Asp	Thr
	1370					1375					1380			
Gln	Asp	Ile	Glu	Ala	Ser	His	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asn	Ser	Asp
	1385					1390					1395			
Tyr	Lys	Arg	Ile	Val	Ala	Cys	Ala	Ser	Tyr	Lys	Pro	Ser	Arg	Glu
	1400					1405					1410			
Glu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	His	Ala	Val	Met	Asp	Ile	Ser	Leu
	1415					1420					1425			
Pro	Thr	Gly	Ile	Ser	Ala	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Val
	1430					1435					1440			
Glu	Gly	Val	Asp	Gln	Leu	Phe	Thr	Asp	Tyr	Gln	Ile	Lys	Asp	Gly
	1445					1450					1455			
His	Val	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Ile	Pro	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu
	1460					1465					1470			
Cys	Val	Arg	Phe	Arg	Ile	Phe	Glu	Leu	Phe	Glu	Val	Gly	Phe	Leu
	1475					1480					1485			
Ser	Pro	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Tyr	Glu	Tyr	His	Arg	Pro	Asp	Lys
	1490					1495					1500			
Gln	Cys	Thr	Met	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys
	1505					1510					1515			
Val	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Cys	Lys	Cys	Val	Glu	Ala	Asp	Cys	Gly
	1520					1525					1530			
Gln	Met	Gln	Glu	Glu	Leu	Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Ala	Glu	Thr	Arg
	1535					1540					1545			
Lys	Gln	Thr	Ala	Cys	Lys	Pro	Glu	Ile	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Val
	1550					1555					1560			

Active_34054223_1_ALXN-156-001 Sequence Listing - COLO 15212 841 003 1
Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys
1565 1570 1575

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1670 1675

34054132_1

1
34054132_1

34054132_1



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

2020

Fecha: 2013 / 04 / 30 /
AAAA MM DD

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-108968-	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

1. folio 94 cd "Listado de secuencias"

Pathy

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
Alexion Pharmaceuticals, Inc.

domiciliado (s) en/of 352 Knotter Drive
Cheshire, Connecticut 06410, United States

15212

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, **CAVELIER ABOGADOS**
WPPODE01-181

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective,

defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enschas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovacion, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelacion voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, proteccion del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelacion administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesion de licencias, la tutela, la proteccion de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos:

defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this February 1, 2006

en/in Cheshire, Connecticut, United States

por/by Thomas Dubin,
Senior Vice President and General Counsel

Firma/Signature 

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by **EDITH N. HUZAR**

3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**

4. in the State of Connecticut for the term of **August 1, 2002 to July 31, 2007**

CERTIFIED

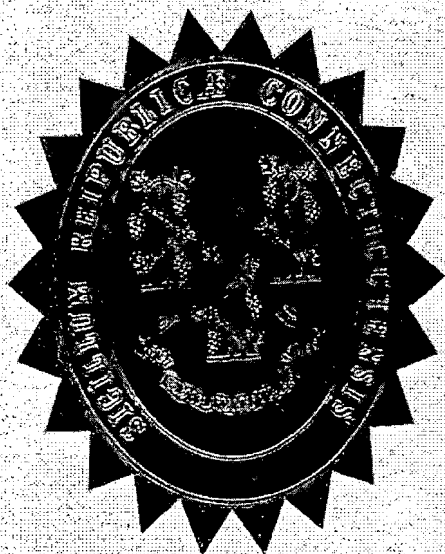
5. at Hartford, Connecticut

6. on **February 8, 2006**

7. by **SUSAN BYSIEWICZ** Secretary of the State of Connecticut

8. Number : **2006-1576**

9. Seal :



10. Signature

A handwritten signature in cursive script, reading "Susan Bysiewicz", written over a horizontal line.

Secretary of the State

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200__ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de _____
compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

— NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO — NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL —

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 1 días del mes de Febrero
de 2006 compareció(eron) ante mí,
Thomas Dubin

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada

Alexion Pharmaceuticals, Inc.
Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
- Artículos de Constitución
 - Estatutos
 - actas de la Junta Directiva
2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
- 2.1. Que es una Sociedad/Compañía Delaware 28/1/92
legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del
Estado de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
352 Knotter Drive, Cheshire, Connecticut 06410, USA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Thomas Dubin

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Cheshire

Estado CT

Hoy 2 Febrero de 2006

— NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO — NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL —

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

CAVELIER ABOGADOS
WPP0001-181

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
2006__ before me, a Notary Public or Attesting Official of _____
personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 1st day of February
2006 appeared before me Thomas Dubin

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named

Alexion Pharmaceuticals, Inc.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
- Certificate of Incorporation
 - Bylaws of the Corporation
 - Minutes of the Board of Directors
2. That the above documents duly prove the following: Delaware 28, 1992
- 2.1. That is a Corporation/Company legally
constituted and in existence in accordance with the laws of the
State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
352 Knotter Drive, Cheshire, Connecticut 06410, United States

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr. (Messrs.) Thomas Dubin

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Cheshire

State CT

This 1 day of February 2006

* Documents must be identified with date and origin

Edith N. Hagen
My commission expires 7/31/07

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 18.02/06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación y Poder en inglés y español, por el cual **ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.**, sociedad domiciliada en 352 Knotter Drive, Cheshire, Connecticut 06410, EUA, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA**.

Dado y firmado el 1 febrero de 2006 en Cheshire, Connecticut, Estados Unidos

Por Thomas Dubin, Vicepresidente Principal y Asesor General

Firma: (firma ilegible)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.** y a la capacidad legal de Thomas Dubin para otorgar poder.

Dado y firmado en la ciudad de Cheshire

Estado de Connecticut

El 1 de febrero de 2006

(Firma), Edith N. Huzar. (En manuscrito) Mi comisión expira el 7/31/07

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

- 2. ha sido firmado por **EDITH N. HUZAR**
- 3. actuando en su capacidad de **NOTARIO PÚBLICO**
- 4. del estado de Connecticut por el término 1 de agosto de 2002 a 31 de julio de 2007

CERTIFICADO

- 5. en Hartford, Connecticut
- 6. el 8 de febrero de 2006
- 7. por **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretario de Estado de Connecticut
- 8. Número: **2006-1576**
- 9. Sello: sello del Estado de Connecticut
- 10. Firma: (firmado), Susan Bysiewicz, Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15212-701-001-4
WPC 15212 - ID 2
FEB 28/06

Maria E. Martelo
TRADUCCION No.: 18.02.06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

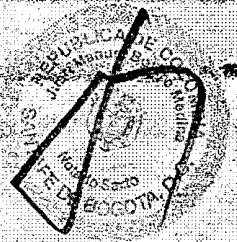
2004 MAR 1 P 1:48

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

b7722
Hana Hovelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESENTENA
LAS FIRMAS INICIADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMAS DE
Hana Hovelo
Hovelo
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 01 MAR 2006



CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

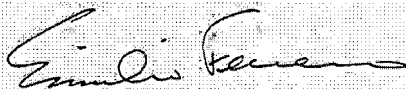
Poderdante : ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.

Poder conferido el : 01/02/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL
 Bogotá D.C. **21 OCT 2009**
 Ante **MARIA FERNANDA CASAS COLL**
 NOTARIA SEXTA(E) DEL CIRCULO DE
 BOGOTÁ D.C.
 Comparación (son) **Emilio Fenero**
Williamson y Luz Clemencia
Suarez de Paez
 Cédulas (s) exhibieron (s) la(s) C.C.
CC 438019 47 31929
CC 35456344 47 2555
 Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia

Emilio Fenero
Luz Clemencia Suarez de Paez



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

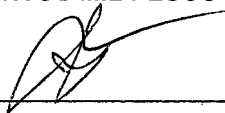
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0035826
		Bogotá D.C., Abril 16 de 2013 - 16:50:20

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871846	16/04/2013	29.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
		=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-108968-00000-0000
Fecha: 2013-04-30 11:07:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

Colo. 15212-841-003-1

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/388,902 2010/10/01 US		(51) Int Cl: C07K 016/018 (71) Solicitante(s) ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (72) Inventor(es) DAVID GIES Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/05/01 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/09/30 No. de solicitud PCT/US2011/054143		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/04/05 N° publicación: WO 2012/044893 A1	
(54) Titulo: POLIPÉPTIDOS QUE SE UNEN AL COMPONENTE DE COMPLEMENTO HUMANO C5			

Resumen:

La presente descripción se relaciona con, inter alia, polipéptidos de unión a C5 y uso de los polipéptidos en métodos para tratar o evitar trastornos asociados con complemento. También se caracterizan equipos terapéuticos que contienen uno o más de los polipéptidos de unión a C5 y significa administrar los polipéptidos a un sujeto.

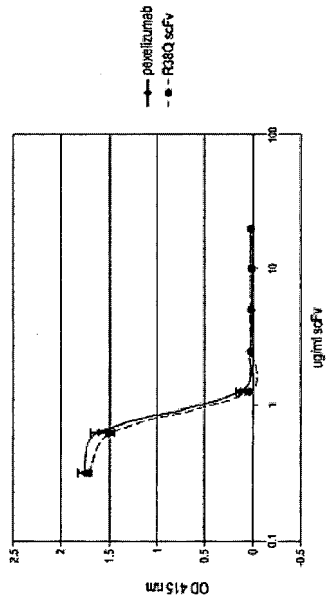


FIG. 1

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

FIN2-F0A (2008-11-1A)



No. 13-108968-00000-0000

Fecha: 2013-04-30 11:07:34
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 103

<i>Ítem</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Ítem</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Ob: ervaciones:

No se puede subir informacion electronica del CD ANEXO A este Documento ya que contiene Archivo en formato tipo TEXTO por el cual no permite su indexacion correcta. Puesto que el sistema solo permite Archivo en formato tipo PDF

Yenny Artonobago