

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLI-PEPTÍDEOS QUE SE LIGAM AO COMPONENTE C5 DO COMPLEMENTO OU À ALBUMINA SÉRICA E SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO"**.

PARÁGRAFO DE INFORMAÇÃO RELACIONADA

[001] Este pedido reivindica o benefício da data de prioridade do Pedido Provisório U.S. No. 62/531.215, depositado em 11 de julho de 2017, cujo conteúdo está aqui incorporado por referência na sua totalidade.

ANTECEDENTES

[002] O componente 5 do complemento (C5) é o quinto componente do complemento, que desempenha um papel importante nos processos inflamatórios e de morte celular. Um peptídeo de ativação, C5a, que é uma anafilatoxina que possui atividade espasmogênica e quimiotáxica potentes, é derivado do polipeptídeo alfa através da clivagem com uma C5-convertase. O produto de clivagem macromolecular C5b pode formar um complexo com o componente do complemento C6 e esse complexo é a base para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que inclui componentes adicionais do complemento.

[003] C5 regulado de maneira inadequada pode levar a pacientes imunocomprometidos ou a distúrbios caracterizados pela degradação celular excessiva (por exemplo, distúrbios hemolíticos causados pela hemólise mediada por C5).

[004] Como C5 mal regulado pode levar a fenótipos graves e devastadores, são necessários moduladores da atividade de C5 com propriedades farmacêuticas favoráveis (por exemplo, meia-vida).

SUMÁRIO

[005] A divulgação fornece polipeptídeos manipulados que se ligam especificamente ao componente C5 do complemento ou albumina

sérica, em que tais polipeptídeos manipulados podem ser sdAbs ou domínios variáveis de Ig. Em algumas modalidades, os polipeptídeos manipulados podem não reduzir ou inibir significativamente a ligação da albumina sérica a FcRn ou não reduzir significativamente a meia-vida da albumina sérica. A descrição também fornece proteínas de fusão que compreendem tais polipeptídeos manipulados, em que tais proteínas de fusão podem ser proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas. A descrição fornece ainda moléculas de ácido nucleico que codificam tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão e métodos para produzir tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão. A descrição fornece ainda composições farmacêuticas que compreendem tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão e métodos de tratamento que utilizam tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão.

[006] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a uma proteína de fusão que compreende um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano e um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, em que o polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano é fundido ao polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana, diretamente ou via um ligante peptídico. Em uma modalidade específica, o resíduo C terminal do polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana é fundido diretamente ou via um ligante ao resíduo N terminal do polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano. Em uma modalidade particular, o resíduo C terminal do polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano é fundido diretamente ou através de um ligante ao resíduo N terminal do polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana. Em uma modalidade

particular, o polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 1-12 e seus fragmentos; e o polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende um aminoácido selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22-34 e seus fragmentos. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11 e o polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Em uma modalidade específica, as proteínas de fusão aqui descritas compreendem ainda um ligante peptídico com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 ou 103. Em uma modalidade particular, a proteína de fusão compreende uma sequência que é pelo menos 95% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 96-101. Em uma modalidade específica, a proteína de fusão consiste em uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 96-101. Em uma modalidade específica, a proteína de fusão consiste em uma sequência polipeptídica de SEQ ID NO: 96. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 13-17, CDR2 compreende um amino sequência de ácidos de SEQ ID NO: 18 ou 19 e CDR3 compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 ou 21. Em uma modalidade particular, o polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos

de SEQ ID NOS: 35-43, CDR2 compreende qualquer uma de as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 44-51 e CDR3 compreendem qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 52-63. Em algumas modalidades, os domínios de ligação ao antígeno aqui descritos, podem ser manipulados ou posteriormente modificados para ligar o antígeno de uma maneira dependente do pH, por exemplo, alta afinidade por antígeno em pH alto e menor afinidade por ligação a antígeno em pH mais baixo ou vice-versa.

[007] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão aqui descrita e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade particular, as composições farmacêuticas podem conter um agente que degrada ou inativa o hialuronano, por exemplo, hialuronidase ou uma hialuronidase recombinante.

[008] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão aqui descrita. A molécula de ácido nucleico pode ser, por exemplo, um vetor de expressão. A descrição é direcionada a células hospedeiras (por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO), células HEK293, células de *Pichia pastoris*, células de mamíferos, células de leveduras, células vegetais) e sistemas de expressão que compreendem ou utilizam os ácidos nucleicos que codificam proteínas de fusão aqui descritas.

[009] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a um polipeptídeo manipulado que se liga ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 1-12 e seus fragmentos. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos

que é pelo menos 90% idêntica (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica) a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 1-12. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 2 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 3 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 4 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 5 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 6 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 7 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 8 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 10 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 11 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade,

o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 12 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela.

[0010] Em outra modalidade, é fornecido um polipeptídeo manipulado que se liga ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo manipulado consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NOS: 1-12 e seus fragmentos. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 3. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 5. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 6. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 7. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 8. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 9. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 10. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 11. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 12.

[0011] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica

humana, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 22-34 e seus fragmentos. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica (por exemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica) a qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 22-34. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 22 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 23 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 24 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 25 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 26 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 27 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 28 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 29 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 30 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a

sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 31 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 32 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 33 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 34 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela.

[0012] Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 22-34 e seus fragmentos. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 22. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 23. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 24. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 25. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 26. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 27. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 28. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 29. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 30. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na

sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 31. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 32. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 33. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 34.

[0013] Em uma modalidade particular, o polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 35-43, CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 44-51 e CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 52-63. Em uma modalidade particular, o polipeptídeo se liga especificamente ao mesmo epítipo na albumina sérica humana que Alb 1.

[0014] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a um método para produzir uma proteína de fusão aqui descrita, que compreende expressar em uma célula hospedeira pelo menos uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão.

[0015] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a um kit terapêutico que compreende: (a) um recipiente que compreende um rótulo; e (b) uma composição que compreende a proteína de fusão aqui descrita; em que o rótulo indica que a composição deve ser administrada a um paciente que tem ou que é suspeito de ter, um distúrbio mediado pelo complemento. O kit pode opcionalmente compreender um agente que degrada ou inativa o hialuronano, por exemplo, hialuronidase ou uma hialuronidase recombinante.

[0016] Em uma modalidade, a descrição é direcionada a um método para o tratamento de um paciente com um distúrbio mediado pelo complemento, o método compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de fusão aqui descrita. Em uma modalidade particular, o distúrbio mediado pelo complemento é selecionado do grupo que consiste em: artrite reumatoide; nefrite lúpica; asma; lesão de isquemia-reperfusão; síndrome urêmica hemolítica atípica; doença de depósito denso; hemoglobinúria paroxística noturna; degeneração macular; hemólise, síndrome com enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas (HELLP); síndrome de Guillain-Barré; Síndrome de CHAPLE; miastenia grave; neuromielite óptica; microangiopatia trombótica pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (pós-HSCT-TMA); TMA pós-transplante de medula óssea (TMA pós-BMT); Doença de Degos; Doença de Gaucher; glomerulonefrite; púrpura trombocitopênica trombótica (TTP); perda fetal espontânea; Vasculite imune de Pauci; epidermólise bolhosa; perda fetal recorrente; esclerose múltipla (EM); traumatismo craniano; e lesão resultante de infarto do miocárdio, circulação extracorpórea e hemodiálise.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] As FIGS. 1A e 1B mostram os resultados de um ensaio de hemólise de uma Via Clássica do Complemento (Complement Classical Pathway (CCP)) para domínios VHH anti-C5.

[0018] A FIG. 2 mostra os resultados de um ensaio de liberação de C5a para domínios VHH anti-C5.

[0019] As FIGS. 3A-3D mostram os resultados de um ensaio de hemólise de CCP para proteínas de fusão biespecíficas.

[0020] A FIG. 4 mostra os resultados de um ensaio Wieslab de CCP para proteínas de fusão bi-específicas.

[0021] A FIG. 5 mostra os resultados de um ensaio de liberação de

C5a para proteínas de fusão bi-específicas.

[0022] As FIGS. 6A e 6B mostram os resultados de um ensaio de quantificação baseado em LC-MS que demonstra a farmacocinética de proteínas de fusão bi-específicas.

[0023] As FIGS. 7A-7D mostram sensorgramas de Biacore que indicam a ligação de FcRn em pH 6,0 no tampão HBS-EP a HSA saturada sem o domínio VHH (controle, FIG. 7A), MSA21 (FIG. 7B), HAS040 (FIG. 7C) ou HAS041 (FIG. 7D).

[0024] As FIGS. 8A-8D mostram sensorgramas de Biacore que indicam a ligação da albumina pelos domínios VHH de HAS020, HAS040, HAS041 e HAS044 em competição com VHH de Alb 1.

[0025] As FIGS. 9A e 9B mostram a capacidade de várias proteínas de fusão bi-específicas para inibir a hemólise.

[0026] A FIG. 10 mostra que CRL0952 (SEQ ID NO: 96) é funcionalmente altamente semelhante à CRL0500 na prevenção de hemólise. CRL0500 é uma proteína de fusão bi-específica que se liga à C5 e albumina com um ligante (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 106).

[0027] As FIGS. 11A-11D mostram a ligação dependente de pH de proteínas de fusão substituídas por histidina.

[0028] As FIGS. 12A e 12B mostram ligação dependente de pH de proteínas de fusão substituídas por histidina.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0029] A descrição fornece polipeptídeos manipulados que se ligam especificamente à albumina sérica ou ao componente C5 do complemento, em que os polipeptídeos manipulados podem ser, por exemplo, domínios variáveis de anticorpos de domínio único (sdAb's) ou imunoglobulina (IgG). Em algumas modalidades, os polipeptídeos manipulados não reduzem ou inibem significativamente a ligação da albumina sérica a FcRn ou não reduzem significativamente a meia-vida da albumina sérica. A descrição também fornece proteínas de fu-

são que compreendem polipeptídeos manipulados, em que as proteínas de fusão podem ser, por exemplo, proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas. A descrição fornece ainda moléculas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão e métodos para produzir tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão. A descrição fornece ainda composições farmacêuticas que compreendem os polipeptídeos manipulados ou as proteínas de fusão e métodos de tratamento que usam esses polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão.

[0030] Metodologias de DNA recombinante padronizadas são usadas para construir polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição, incorporar tais polinucleotídeos em vetores de expressão recombinantes e introduzir esses vetores nas células hospedeiras para produzir os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição. Veja, por exemplo, Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). A menos que definições específicas sejam fornecidas, a nomenclatura utilizada em conexão com e os procedimentos e técnicas de laboratório de, química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica aqui descritos são aqueles conhecidos e comumente usados na técnica. Da mesma forma, técnicas convencionais podem ser usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, liberação e tratamento de pacientes.

Definições

[0031] Conforme utilizado de acordo com a presente descrição, as expressões a seguir, salvo indicação em contrário, devem ser entendidos como tendo os significados a seguir. Salvo indicação em contrário pelo contexto, as expressões no singular devem incluir pluralidades e as expressões no plural devem incluir o singular.

[0032] Como usada aqui, a expressão "domínio de ligação" se refere à porção de uma proteína ou anticorpo que compreende os resíduos de aminoácidos que interagem com um antígeno. Os domínios de ligação incluem, mas não estão limitados a, anticorpos (por exemplo, anticorpos de extensão completa), assim como suas porções de ligação ao antígeno. O domínio de ligação confere ao agente de ligação sua especificidade e afinidade pelo antígeno. A expressão também abrange qualquer proteína que possua um domínio de ligação que seja homólogo ou amplamente homólogo a um domínio de ligação à imunoglobulina.

[0033] A expressão "anticorpo", como aqui referida, inclui anticorpos completos e qualquer fragmento de ligação ao antígeno (isto é, "porção de ligação ao antígeno") ou sua versão de cadeia simples. Um "anticorpo" se refere, em uma modalidade preferida, a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, ou sua porção de ligação ao antígeno. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é composta por um domínio, CL. As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas da terminação amino a terminação carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um

antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

[0034] A expressão "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "fragmento de anticorpo"), como usada aqui, se refere a um ou mais fragmentos ou partes de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Tais "fragmentos" têm, por exemplo, entre cerca de 8 e cerca de 1500 aminoácidos de extensão, adequadamente entre cerca de 8 e cerca de 745 aminoácidos de comprimento, adequadamente entre cerca de 8 a cerca de 300, por exemplo, entre cerca de 8 a cerca de 200 aminoácidos, ou cerca de 10 a cerca de 50 ou 100 aminoácidos de extensão. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de extensão completa. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pela expressão "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios V_L , V_H , CL e $CH1$; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios V_H e $CH1$; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546)), que consiste em um domínio V_H ; e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem opcionalmente ser unidas por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam produzidos como uma

única cadeia proteica na qual as regiões V_L e V_H pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (sFv); veja, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Esses anticorpos de cadeia simples também devem estar incluídos na expressão "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas por aqueles versados na técnica e os fragmentos são pesquisados quanto à utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos. As porções de ligação ao antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de imunoglobulinas intactas.

[0035] A expressão "anticorpo humano recombinante", como usada aqui, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir deles, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca combinatória de anticorpos humanos recombinantes e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva o splicing de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes que compreendem regiões variáveis e constantes que utilizam determinadas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana são codificados pelos genes da linha germinativa, mas incluem rearranjos e mutações subsequentes que ocorrem, por exemplo, durante a maturação do anticorpo. Como conhecido na técnica (ver, por exemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9):

1117-1125)), a região variável contém o domínio de ligação ao antígeno, que é codificado por vários genes que se reorganizam para formar um anticorpo específico para um antígeno estranho. Além do rearranjo, a região variável pode ser modificada ainda mais por múltiplas alterações únicas de aminoácidos (denominadas mutação somática ou hipermutação) para aumentar a afinidade do anticorpo com o antígeno estranho. A região constante mudará em resposta adicional a um antígeno (isto é, troca de isotipo). Portanto, as moléculas de ácido nucleico reorganizadas e somaticamente mutadas que codificam os polipeptídeos da cadeia leve e da cadeia pesada da imunoglobulina em resposta a um antígeno, podem não ter identidade de sequência com as moléculas originais de ácido nucleico, mas serão substancialmente idênticas ou semelhantes (ou seja, têm pelo menos 80% de identidade).

[0036] A expressão "anticorpo humano", como usada aqui, se refere a uma imunoglobulina (Ig) que é usada, por exemplo, pelo sistema imunológico para ligar e neutralizar patógenos. A expressão inclui anticorpos que possuem regiões variáveis e constantes que correspondem substancialmente às sequências de Ig da linha germinativa humana. Em algumas modalidades, os anticorpos humanos são produzidos em mamíferos não humanos, incluindo, entre outros, roedores, tais como camundongos e ratos e lagomorfos, tais como coelhos. Em outras modalidades, os anticorpos humanos são produzidos nas células de hibridoma. Ainda em outras modalidades, anticorpos humanos são produzidos recombinantemente. Como usado aqui, os anticorpos humanos incluem todo ou uma porção de um anticorpo incluindo, por exemplo, as cadeias pesadas e leves, regiões variáveis, regiões constantes, fragmentos proteolíticos, regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e outros fragmentos funcionais.

[0037] Como usado aqui, "fragmento biologicamente ativo" se refe-

re a uma porção de uma molécula, por exemplo, um gene, sequência codificadora, mRNA, polipeptídeo ou proteína, que possui um comprimento ou função biológica desejada. Um fragmento biologicamente ativo de uma proteína, por exemplo, pode ser um fragmento da proteína de extensão completa que retém uma ou mais atividades biológicas da proteína. Um fragmento biologicamente ativo de um mRNA, , pode ser um fragmento que, quando traduzido, expressa um fragmento de proteína biologicamente ativo. Um fragmento de mRNA biologicamente ativo, além disso, pode compreender versões encurtadas de sequências não codificadoras, por exemplo , sequências regulatórias, UTRs, etc. Em geral, um fragmento de uma enzima ou molécula de sinalização pode ser, por exemplo, aquela porção da molécula que retém sua atividade sinalizadora ou enzimática. Um fragmento de um gene ou sequência codificadora, por exemplo, pode ser aquela porção do gene ou sequência codificadora que produz um fragmento do produto de expressão. Um fragmento não precisa necessariamente ser definido funcionalmente, pois também pode se referir a uma porção de uma molécula que não é a molécula inteira, mas possui alguma característica ou comprimento desejado (por exemplo, fragmentos de restrição, fragmento proteolítico de uma proteína, fragmentos de amplificação etc.).

[0038] Anticorpos de mamíferos comuns ou convencionais compreendem um tetrâmero, que é tipicamente composto por dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, cada par tendo uma cadeia "leve" de extensão completa (tipicamente com um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" de extensão completa "(tipicamente tendo um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). As expressões "cadeia pesada" e "cadeia leve", como usadas aqui, se referem a qualquer polipeptídeo de Ig que possui uma sequência de domínio variável suficiente para conferir especificidade por um antígeno alvo. A

porção N terminal de cada cadeia leve e pesada inclui tipicamente um domínio variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que normalmente é responsável pelo reconhecimento do antígeno. A porção C terminal de cada cadeia tipicamente define um domínio constante responsável pela função efetora. Assim, em um anticorpo que ocorre naturalmente, um polipeptídeo de cadeia pesada de Ig de extensão completa inclui um domínio variável (V_H ou VH) e três domínios constantes (C_{H1} ou CH1, C_{H2} ou CH2 e C_{H3} ou CH3), em que o domínio VH está na terminação N do polipeptídeo e o domínio C_{H3} está na terminação C e um polipeptídeo da cadeia leve de Ig de extensão completa inclui um domínio variável (V_L ou VL) e um domínio constante (C_L ou CL), em que o domínio V_L está na terminação N do polipeptídeo e o domínio C_L está na terminação C.

[0039] Dentro de cadeias leves e pesadas de extensão completa, os domínios variáveis e constantes são tipicamente unidos por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" com cerca de 10 ou mais aminoácidos. As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada formam tipicamente um sítio de ligação ao antígeno. Os domínios variáveis dos anticorpos que ocorrem naturalmente exibem tipicamente a mesma estrutura geral de regiões estruturais relativamente conservadas (FR) unidas por três regiões hipervariáveis chamadas CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são tipicamente alinhadas pelas regiões estruturais, o que permite a ligação a um epítipo específico. Da terminação N para a terminação C, os domínios variáveis da cadeia leve e pesada compreendem tipicamente os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[0040] As expressões "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado", como usadas aqui, se referem a um composto ou espécie que é a espécie predominante presente em uma composição

(isto é, em uma base molar é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição). Uma fração substancialmente purificada, por exemplo, pode ser uma composição em que a espécie predominante compreende pelo menos cerca de 50% (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes. Uma composição substancialmente pura, por exemplo, pode compreender uma espécie predominante que representa mais do que cerca de 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição. Em outras modalidades, as espécies predominantes podem ser purificadas até uma homogeneidade substancial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais) em que a composição consiste essencialmente em uma única espécie macromolecular.

[0041] As expressões "antígeno" ou "antígeno alvo", como usadas aqui, se referem a uma molécula ou uma porção de uma molécula que é capaz de ser ligada a um anticorpo, um ou mais domínio de ligação de Ig ou outra porção de ligação imunológica incluindo, por exemplo, os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão aqui descritos. Um antígeno é capaz de ser usado em um animal para produzir anticorpos capazes de se ligar a um epítopo desse antígeno. Um antígeno pode ter um ou mais epítopos.

[0042] A expressão "epítopo" ou "determinante antigênico" se refere a um local em um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo se liga especificamente. Os epítopos podem ser formados a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos pelo enovelamento terciário de uma proteína. Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos na exposição a solventes desnaturantes, enquanto que os epítopos formados por enovelamento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Os métodos para determinar quais epítomos estão ligados por um determinado anticorpo (isto é, mapeamento de epítomo) são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ensaios de immunoblotting e imunoprecipitação, em que peptídeos superpostos ou contíguos do antígeno são testados quanto à reatividade com o dado anticorpo. Os métodos para determinar a conformação espacial dos epítomos incluem técnicas conhecidas e aquelas aqui descritas, por exemplo, cristalografia com raios-x e ressonância magnética nuclear bidimensional (ver, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0043] As expressões "atividade", "atividade biológica" ou "propriedade biológica", como usadas em referência aos polipeptídeos manipulados ou às proteínas de fusão da descrição, incluem, mas não estão limitadas a afinidade e especificidade do epítomo, capacidade de antagonizar a atividade de um antígeno alvo, a estabilidade *in vivo* dos polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição e as propriedades imunogênicas dos polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição. Outras propriedades biológicas identificáveis incluem, por exemplo, reatividade cruzada (por exemplo, com homólogos não humanos do antígeno alvo ou com outros alvos ou tecidos antigênicos, geralmente) e capacidade de preservar altos níveis de expressão de proteína nas células de mamíferos.

[0044] Um anticorpo, imunoglobulina ou fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão aqui descritas, são ditos se ligar "especificamente" a um antígeno quando a molécula reconhece preferencialmente seu antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. A expressão "se liga especificamente", como usada aqui, se refere à capacidade de um anticorpo, imunoglobulina ou fragmento de

imunoglobulina imunologicamente funcional ou um polipeptídeo manipulado ou proteína de fusão da descrição, para se ligar a um antígeno que contém um epítipo com um K_D de pelo menos cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M ou mais, e/ou para se ligar a um epítipo com uma afinidade que seja pelo menos duas vezes maior que a sua afinidade por um antígeno não específico.

[0045] A expressão " K_D ", como usada aqui, se refere à constante de dissociação da interação entre um anticorpo, imunoglobulina ou fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional, ou um polipeptídeo manipulado ou proteína de fusão aqui descrita e um antígeno alvo. Quando um polipeptídeo manipulado ou proteína de fusão da descrição compreende uma sequência de Ig monovalente, a sequência de Ig monovalente se liga preferivelmente a um antígeno desejado, por exemplo, com um K_D de 10^{-5} a 10^{-12} M ou menos, ou 10^{-7} a 10^{-12} M ou menos, ou 10^{-3} a 10^{-12} M e/ou com uma afinidade de ligação de pelo menos 10^7 M⁻¹, pelo menos 10^8 M⁻¹, pelo menos 10^9 M⁻¹ ou pelo menos 10^{12} M⁻¹. Um valor de K_D maior que 10^4 M é geralmente considerado indicar ligação não específica. Em algumas modalidades, uma sequência de Ig monovalente de um polipeptídeo manipulado ou proteína de fusão da descrição se liga a um antígeno desejado com uma afinidade menor do que 500 mM, menor do que 200 nM, menor do que 10 nM ou menor do que 500 pM.

[0046] Uma K_D pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ressonância de plasma de superfície (SPR). Geralmente, a análise de SPR mede interações de ligação em tempo real entre um ligante (um antígeno alvo em uma matriz de biosensor) e um analito usando, por exemplo, o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). A análise de SPR também pode ser realizada imobilizando um analito e apresentando o ligante. A ligação específica de um polipeptídeo manipulado ou proteína de fusão da

descrição a um antígeno ou determinante antigênico também pode ser determinada de qualquer maneira adequada conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, análise de Scatchard e/ou ensaios de ligação competitiva, tais como radio-imunoensaios (RIA), imunoensaios enzimáticos (EIA) e ensaios de competição sanduíche.

[0047] A expressão "biespecífico" se refere a uma proteína de fusão da descrição que é capaz de se ligar a dois antígenos. A expressão "proteína de fusão multivalente" significa uma proteína de fusão que compreende dois ou mais sítios de ligação ao antígeno.

[0048] A expressão "proteína de fusão multiespecífica" se refere a uma proteína de fusão da descrição que é capaz de se ligar a dois ou mais alvos relacionados ou não relacionados.

[0049] A expressão "fundido a" como usada aqui se refere a um polipeptídeo produzido pela combinação de mais de uma sequência, tipicamente pela clonagem de uma sequência, por exemplo, uma sequência codificadora, em um vetor de expressão em fase de leitura com uma ou mais sequências codificadoras secundárias, de modo que as duas (ou mais) sequências codificadoras sejam transcritas e traduzidas em um único polipeptídeo contínuo. Além de serem feitos com tecnologia recombinante, partes de um o polipeptídeo pode ser "fundidas" uma a outra por meio de reação química, ou outros meios conhecidos na técnica para produzir polipeptídeos personalizados.

[0050] A expressão "vetor", como usada aqui, se refere a qualquer molécula (por exemplo, ácido nucleico, plasmídeo ou vírus) que é usada para transferir informações de codificação para um sistema de expressão (por exemplo, uma célula hospedeira ou sistema de expressão in vitro). Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma molécula de DNA de fita dupla circular (dsDNA), na qual segmentos adicionais de DNA podem ser inseridos. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser inseridos em

um genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que possuem uma origem bacteriana de replicação e vetores de mamíferos epissomais). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não epissomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira e, assim, são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de sequências codificadoras às quais eles estão operativamente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão".

[0051] A expressão "operativamente ligado", como usada aqui, se refere a um arranjo de sequências flanqueadoras em que as sequências flanqueadoras são configuradas ou montadas para executar uma função desejada. Assim, uma sequência flanqueadora operativamente ligada a uma sequência codificadora pode ser capaz de efetuar a replicação, transcrição e/ou tradução da sequência codificadora. Uma sequência codificadora está operativamente ligada a um promotor, por exemplo, onde o promotor é capaz de direcionar a transcrição dessa sequência codificadora. Uma sequência flanqueadora não precisa ser contígua à sequência codificadora para ser considerada operativamente ligada, desde que funcione corretamente.

[0052] A expressão "célula hospedeira", como usada aqui, se refere a uma célula na qual um vetor de expressão foi introduzido. Uma célula hospedeira pretende se referir não apenas à célula em questão, mas também à progênie dessa célula. Como certas modificações podem ocorrer nas gerações seguintes devido a mutações ou influências ambientais, essa progênie pode não ser, de fato, idêntica à célula parental, mas essas células ainda estão incluídas no escopo da expressão "célula hospedeira", conforme usada aqui. Uma grande variedade de sistemas de expressão de células hospedeiras pode ser usada para

expressar os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição, incluindo sistemas de expressão bacteriana, de levedura, baculoviral e de mamífero (assim como sistemas de expressão de apresentação em fago).

[0053] A expressão "que ocorre naturalmente", como usada aqui e aplicada a uma molécula em particular, se refere a uma molécula que é encontrada na natureza e não foi manipulada pelo homem. Da mesma forma, a expressão "que não ocorre naturalmente", como usada aqui, se refere a uma molécula que não é encontrada na natureza ou que tenha sido modificada ou sintetizada artificialmente.

[0054] A expressão "manipulado", como usada aqui e aplicada a uma molécula específica tal como, por exemplo, um polipeptídeo que foi modificado ou manipulado, tal como por mutação, truncamento, deleção, substituição, adição, conjugação ou pela alteração de outra forma da sequência primária, estrutura química ou tridimensional, assinatura química, comportamento de enovelamento, estado de glicosilação ou qualquer outro atributo da molécula, de modo que a molécula difira de sua contraparte que ocorre naturalmente.

[0055] A expressão "paciente", tal como usada aqui, inclui indivíduos humanos e animais.

[0056] Um "distúrbio" é qualquer condição que se beneficiaria do tratamento usando os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição. "Distúrbio" e "condição" são aqui utilizados alternativamente.

[0057] Um "distúrbio mediado pelo complemento", como usado aqui, se refere a um distúrbio causado, direta ou indiretamente, pela regulação incorreta da via do complemento, por exemplo, ativação ou supressão da via do complemento ou um distúrbio que é mediado, direta ou indiretamente, por um ou mais componentes da via do complemento ou por um produto gerado pela via do complemento. A ex-

pressão também se refere a um distúrbio que é exacerbado por um ou mais componentes da via do complemento ou a um produto gerado pela via do complemento.

[0058] As expressões "tratamento" ou "tratar", como usada aqui, se referem ao tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles que precisam de tratamento incluem aqueles que possuem o distúrbio, assim como aqueles em risco de ter o distúrbio ou aqueles em que o distúrbio deve ser prevenido.

[0059] Como usada aqui, uma quantidade "terapeuticamente eficaz" de, por exemplo, uma proteína de fusão ou polipeptídeo manipulado aqui descrito, é uma quantidade que, quando administrada, resulta em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença (por exemplo, uma diminuição nos sintomas de distúrbios associados a um distúrbio mediado pelo complemento, um aumento na frequência e duração dos períodos livres de sintomas da doença ou na prevenção de comprometimento ou incapacidade devido à aflição da doença. Em certas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico aqui descrito pode incluir uma quantidade (ou várias quantidades no caso de múltiplas administrações) que reduza a hemólise ou melhore os sintomas de um distúrbio mediado pelo complemento.

[0060] As expressões "composição farmacêutica" ou "composição terapêutica", Como usada aqui, se referem a um composto ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado a um paciente.

[0061] A expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" ou "veículo fisiologicamente aceitável", como usada aqui, se refere a um ou mais materiais de formulação adequados para realizar ou melhorar a liberação dos polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição.

[0062] A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz", conforme usada em referência a uma composição farmacêutica que compreende um ou mais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição, se refere a uma quantidade ou dosagem suficientes para produzir um resultado terapêutico desejado. Mais especificamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade de um ou mais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão da descrição suficientes para inibir, por algum período de tempo, um ou mais dos processos patológicos clinicamente definidos associados com a condição a ser tratada, por exemplo, um distúrbio mediado pelo complemento. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo do polipeptídeo específico manipulado ou da proteína de fusão que está sendo usada e depende de uma variedade de fatores e condições relacionados ao paciente que está sendo tratado e a gravidade do distúrbio.

Sistema do Complemento

[0063] O sistema do complemento atua em conjunto com outros sistemas imunológicos do corpo para se defender contra a intrusão de patógenos celulares e virais. Existem pelo menos 25 proteínas do complemento, que são uma coleção complexa de proteínas plasmáticas e cofatores de membrana. As proteínas plasmáticas representam cerca de 10% das globulinas no soro de vertebrados. Os componentes do complemento atingem suas funções imunológicas defensivas pela interação em uma série de eventos de clivagem enzimática intrincados, mas precisos e de ligação à membrana. A cascata do complemento resultante leva à produção de produtos com funções opsônicas, imuno-reguladoras e líticas.

[0064] A cascata de complemento pode progredir pela via clássica (CP), via lectina ou via alternativa (AP). A via da lectina é tipicamente iniciada com a ligação da lectina que se liga à manose (MBL) a subs-

tratos com alto teor de manose. AP pode ser independente de anticorpos e iniciada por certas moléculas nas superfícies de patógenos. A CP é tipicamente iniciada pelo reconhecimento de anticorpos e pela ligação a um sítio antigênico em uma célula alvo. Essas vias convergem para C3 convertase, onde o componente C3 do complemento é clivado por uma protease ativa para produzir C3a e C3b.

[0065] A hidrólise espontânea do componente C3 do complemento, que é abundante na fração plasmática do sangue, também pode levar ao início da AP C3 convertase. Esse processo, conhecido como "tickover", ocorre através da clivagem espontânea de uma ligação tioéster em C3 para formar C3i ou C3(H₂O). Tickover é facilitado pela presença de superfícies que suportam a ligação de C3 ativado e/ou têm características de carga neutras ou positivas (por exemplo, superfícies celulares bacterianas). A formação de C3(H₂O) permite a ligação do fator B da proteína plasmática, que por sua vez permite ao fator D clivar o fator B em Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado a C3 para formar um complexo contendo C3(H₂O)Bb— a "fase fluida" ou "iniciação" de C3 convertase. Embora produzida apenas em pequenas quantidades, a C3 convertase em fase fluida pode clivar várias proteínas C3 em C3a e C3b e resultar na geração de C3b e sua subsequente ligação covalente a uma superfície (por exemplo, uma superfície bacteriana). O fator B ligado ao C3b ligado à superfície é clivado pelo fator D para formar o complexo AP C3 convertase ligado à superfície contendo C3b,Bb.

[0066] A AP C5 convertase ((C3b)₂,Bb) é formada pela adição de um segundo monômero de C3b à AP C3 convertase. O papel da segunda molécula de C3b é ligar a C5 e apresentá-la à clivagem por Bb. As convertases AP C3 e C5 são estabilizadas pela adição da proteína trimérica properdina. A ligação adequada a properdina, no entanto, não é necessária para formar uma via alternativa funcional de C3 ou

C5 convertase.

[0067] A CP C3 convertase é formada depois da interação do componente C1 do complemento, que é um complexo de C1q, C1r e C1s, com um anticorpo que está ligado a um antígeno alvo (por exemplo, um antígeno microbiano). A ligação da porção C1q de C1 ao complexo anticorpo-antígeno causa uma alteração conformacional em C1 que ativa C1r. C1r ativo cliva então C1s associado a C1 para gerar uma serina protease ativa. C1s ativo cliva o componente C4 do complemento em C4b e C4a. Como C3b, o fragmento C4b recém-gerado contém um tiol altamente reativo que forma prontamente ligações amida ou éster com moléculas adequadas em uma superfície alvo (por exemplo, uma superfície celular microbiana). C1s também cliva o complemento C2 em C2b e C2a. O complexo formado por C4b e C2a é a CP C3 convertase, que é capaz de processar C3 em C3a e C3b. A CP C5 convertase (C4b, C2a, C3b) é formada pela adição de um monômero C3b à CP C3 convertase.

[0068] Além de seu papel nas C3 e C5 convertases, C3b também funciona como opsonina através da sua interação com receptores do complemento presentes nas superfícies de células que apresentam antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas. A função opsonica de C3b é geralmente considerada uma das funções anti-infecciosas mais importantes do sistema do complemento. Pacientes com lesões genéticas que bloqueiam a função C3b são propensos à infecção por uma ampla variedade de organismos patogênicos, enquanto pacientes com lesões posteriores na sequência da cascata do complemento, ou seja, pacientes com lesões que bloqueiam as funções de C5, são mais propensos apenas a infecção por *Neisseria* infecção e apenas um pouco mais propensos.

[0069] As AP e CP C5 convertases clivam C5 em C5a e C5b. A clivagem de C5 libera C5a, uma potente anafilatoxina e fator quimiotá-

xico, e C5b, que permite a formação do complexo de complemento do terminal lítico, C5b-9. C5b se combina com C6, C7 e C8 para formar o complexo C5b-8 na superfície da célula alvo. Após a ligação de várias moléculas de C9, é formado o complexo de ataque à membrana (MAC, C5b-9, complexo de complemento terminal ("TCC")). Quando um número suficiente de MACs se insere nas membranas das células alvo, as aberturas que eles criam (poros MAC) medeiam a rápida lise osmótica das células alvo.

[0070] Embora um sistema de complemento que funcione adequadamente forneça uma defesa robusta contra a infecção por micróbios, a regulação ou ativação inadequada das vias do complemento tem sido implicada na patogênese de uma variedade de distúrbios, incluindo, por exemplo, artrite reumatoide; nefrite lúpica; asma; lesão de isquemia-reperfusão; síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS); doença de depósito denso (DDD); hemoglobinúria paroxística noturna (PNH); degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada à idade (AMD)); hemólise, síndrome com enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas (HELLP); síndrome de Guillain-Barré (GBS); enteropatia com perda de proteína (por exemplo, Síndrome de CHAPLE); miastenia gravis (MG); neuromielite óptica (NMO); microangiopatia trombótica pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (pós-HSCT-TMA); TMA pós-transplante de medula óssea (TMA pós-BMT); Doença de Degos; Doença de Gaucher; glomerulonefrite; púrpura trombocitopênica trombótica (TTP); perda fetal espontânea; vasculite imune de Pauci; epidermólise bolhosa; perda fetal recorrente; esclerose múltipla (MS); traumatismo craniano; e lesão resultante de infarto do miocárdio, circulação extracorpórea e hemodiálise. (Holers, V., *Immunol. Rev.*, 223:300-16, 2008). A regulação negativa da ativação do complemento demonstrou ser eficaz no tratamento de várias indicações de doenças em uma variedade de modelos em animais

(Rother, R. *et al.*, *Nat. Biotechnol*, 25: 1256 -64, 2007; Wang, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8563-8, 1996; Wang, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8955-9, 1995; Rinder, C. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 96: 1564-72, 1995; Kroshus, T. *et al.*, *Transplantation*, 60: 1194-202, 1995; Homeister, J. *et al.*, *J. Immunol*, 150: 1055-64, 1993; Weisman, H. *et al.*, *Science*, 249: 146-51, 1990; Amsterdam, E. *et al.* *J. Physiol*, 268: H448-57, 1995; e Rabinovici, R. *et al.*, *J. Immunol*, 149: 1744-50, 1992).

Albumina Sérica Humana e Receptor Fc Neonatal

[0071] Polipeptídeos que podem se ligar à albumina sérica humana (HSA) para aumentar a meia-vida de proteínas terapeuticamente relevantes têm sido descritos (WO 91/01743, WO 01/45746 e WO 02/076489). As porções peptídicas descritas, no entanto, são de origem bacteriana ou sintética, o que não é preferido para uso em terapêutica em humanos. WO 04/041865 descreve anticorpos de domínio único (sdAb's ou Nanobodies[®]) direcionados contra albumina sérica (e em particular contra HSA) que podem ser ligados a outras proteínas (tais como um ou mais outros sdAb's direcionados contra um alvo desejado) para aumentar a meia-vida da proteína.

[0072] O receptor Fc neonatal (FcRn), também denominado "receptor Brambell", está envolvido no prolongamento da vida útil da albumina em circulação (Chaudhury, C. *et al.*, *J. Exp. Med.* 3: 315-22, 2003). FcRn é uma glicoproteína de membrana integral que consiste em uma cadeia leve solúvel que consiste em β 2-microglobulina (β 2m), não covalentemente ligada a uma cadeia α de 43 kDa, com três domínios extracelulares, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática de cerca de 50 aminoácidos. A cauda citoplasmática contém um sinal de endocitose de motivo de dinucleotídeo implicado na internalização do receptor. A cadeia α é um membro da família de proteínas MHC I não clássica. A associação de β 2m com a cadeia α é crí-

tica para enovelar corretamente FcRn e sair do retículo endoplasmático para direcionar para os endossomas e a superfície celular.

[0073] A estrutura geral de FcRn é semelhante à das moléculas da classe I. As regiões α -1 e α -2 se assemelham a uma plataforma composta por oito fitas antiparalelas que formam uma única folha β encimada por duas hélices α antiparalelas muito semelhantes à fenda peptídica nas moléculas de MHC I. Devido ao reposicionamento geral da hélice α -1 e à flexão da porção C-terminal da hélice α -2 devido a uma quebra na hélice introduzida pela presença do Pro162, as hélices de FcRn estão em íntima proximidade, obstruindo a ligação peptídica. A cadeia lateral de Arg164 de FcRn também oclui a interação potencial do peptídeo N-terminal com o bolso de MHC. Além disso, a ponte de sal e a interação hidrofóbica entre as hélices α -1 e α -2 também podem contribuir para o fechamento do sulco. Portanto, o FcRn não participa da apresentação do antígeno e a fenda peptídica está vazia.

[0074] FcRn se liga e transporta a IgG através do sinciciotrofoblasto placentário da circulação materna para a circulação fetal e protege a IgG da degradação em adultos. Além da homeostase, FcRn controla a transcitose da IgG nos tecidos. FcRn está localizado nas células epiteliais, células endoteliais e hepatócitos.

[0075] HSA se liga à FcRn para formar um complexo tri-molecular com IgG. Ambas, albumina e IgG se ligam de maneira não cooperativa em sítios distintos em FcRn. A ligação de FcRn humano a Sepharose-HSA e Sepharose-hIgG é dependente do pH, sendo máxima em pH 5 e indetectável em pH 7 a pH 8. A observação de que FcRn se liga a albumina da mesma maneira dependente do pH como ele se liga a IgG, sugere que o mecanismo pelo qual a albumina interage com o FcRn e, portanto, é protegido da degradação é idêntico àquele de IgG e mediado através de uma interação sensível ao pH idêntica àquela de FcRn. Foi demonstrado que o uso de ressonância de plasma de super-

fície para medir a capacidade de domínios individuais de HSA de se ligarem a hFcRn solúvel imobilizado, FcRn e albumina mostraram interação através do domínio D-III da albumina de maneira dependente do pH, em um local distinto do sítio de ligação da IgG (Chaudhury, C. et al., *Biochemistry*, 45: 4983-90, 2006).

Polipeptídeos Manipulados se Ligam especificamente ao Complemento C5 ou Albumina Sérica

[0076] São descritos aqui polipeptídeos manipulados que compreendem sequências de Ig, por exemplo, sequências de domínio variável de Ig, que podem se ligar ou se associar ao componente C5 do complemento ou albumina sérica. Os polipeptídeos manipulados aqui descritos podem se ligar especificamente à albumina sérica de tal maneira que, quando o polipeptídeo manipulado está ligado ou associado de outra maneira a uma molécula de albumina sérica, a ligação da molécula de albumina sérica ao FcRn não é significativamente reduzida ou inibida em comparação com a ligação da molécula de albumina sérica a FcRn quando o polipeptídeo não está ligado a ela. Nesta modalidade, "não reduzida ou inibida significativamente" significa que a afinidade de ligação da albumina sérica ao FcRn (conforme medida usando um ensaio adequado, tal como, por exemplo, SPR) não está reduzida em mais de 50% ou em mais de 30%, ou mais de 10%, ou mais de 5%, ou não está reduzida. Nesta modalidade, "não significativamente reduzida ou inibida" também significa que a meia-vida da molécula de albumina sérica não está significativamente reduzida. Em particular, os polipeptídeos manipulados podem conter resíduos de aminoácidos na albumina sérica que não estão envolvidos na ligação da albumina sérica a FcRn. Mais particularmente, polipeptídeos manipulados podem se ligar a resíduos de aminoácidos ou sequências de albumina sérica que não fazem parte do domínio III da albumina sérica, por exemplo, polipeptídeos manipulados que são capazes de se ligar a resíduos de

aminoácidos ou sequências de albumina sérica que fazem parte de domínio I e/ou domínio II.

[0077] Em algumas modalidades, os polipeptídeos manipulados são sdAbs ou adequados para uso como sdAbs e, como tal, podem ser uma sequência de domínio variável de cadeia pesada ou uma sequência de domínio variável de cadeia leve e, em certas modalidades, são sequências de domínio variável de cadeia pesada de um anticorpo de cadeia pesada. Nos casos em que os polipeptídeos manipulados são de domínio único, sequências de domínio variável de cadeia pesada de um anticorpo de cadeia pesada, essas sequências podem ser referidas como anticorpos VHH ou V_HH, fragmentos VHH ou V_HH de anticorpo ou domínios VHH ou V_HH.

[0078] Um "anticorpo de cadeia pesada" se refere a um anticorpo que consiste em duas cadeias pesadas e não possui as duas cadeias leves encontradas nos anticorpos convencionais. Camelídeos (membros da família biológica *Camelidae*, a única família atualmente viva na subordem *Tylopoda*; camelídeos existentes incluem camelos dromedários, camelos bactrianos, camelos selvagens ou não domesticados, lhamas, alpacas, vicunhas e guanacos) são os únicos mamíferos com anticorpos VHH de cadeia simples. Cerca de 50% dos anticorpos nos camelídeos são anticorpos de cadeia pesada, sendo os outros 50% do tipo de anticorpo de cadeia pesada/leve de mamífero comum ou convencional.

[0079] "Domínio VHH" se refere a domínios variáveis presentes em anticorpos de cadeia pesada que ocorre naturalmente para distingui-los dos domínios variáveis de cadeia pesada que estão presentes nos anticorpos convencionais de quatro cadeias (aqui referidos como "domínios VH") e dos domínios variáveis de cadeia leve presentes em anticorpos convencionais de quatro cadeias (aqui referidos como "domínios VL").

[0080] Os domínios VHH têm várias características estruturais e propriedades funcionais únicas que produzem domínios VHH isolados (assim como sdAbs, que são baseados em domínios VHH e compartilham essas características estruturais e propriedades funcionais com os domínios VHH que ocorrem naturalmente) e proteínas que contêm os domínios VHH altamente vantajosos para uso como domínios ou proteínas funcionais de ligação ao antígeno. Por exemplo, os domínios VHH, que se ligam a um antígeno sem a presença de uma VL, e os sdAbs podem funcionar como uma única unidade, domínio ou proteína estrutural de ligação ao antígeno funcional, relativamente pequena e funcional. O pequeno tamanho dessas moléculas distingue os domínios VHH dos domínios VH e VL dos anticorpos convencionais de quatro cadeias. O uso de domínios VHH e sdAbs como proteínas únicas de ligação ao antígeno ou como domínios de ligação ao antígeno (por exemplo, como parte de uma proteína ou polipeptídeo maior) oferece várias vantagens significativas sobre o uso dos domínios convencionais VH e VL, assim bem como scFv ou fragmentos de anticorpo convencionais (como fragmentos Fab ou F(ab')₂). Somente um único domínio é necessário para ligar um antígeno com alta afinidade e com alta seletividade, por exemplo, para que não haja necessidade de dois domínios separados presentes, nem para garantir que esses dois domínios estejam presentes em uma configuração e conformação espacial específicas (por exemplo, através do uso de ligantes específicos, como em um scFv). Os domínios VHH e sdAbs também podem ser expressos a partir de um único gene e não requerem dobras ou modificações pós-traducionais. Os domínios VHH e sdAbs podem ser facilmente projetados em formatos multivalentes e multiespecíficos. Os domínios VHH e sdAbs também são altamente solúveis e não tendem a se agregar (Ward, E. et al, *Nature*, 341: 544-6, 1989), e são altamente estáveis ao calor, pH, proteases e outros agentes ou condições

desnaturantes (Ewert, S. et al., *Biochemistry*, 41:3628-36, 2002). Os domínios VHH e sdAbs são relativamente fáceis e baratos de preparar, mesmo na escala necessária para a produção. Por exemplo, domínios VHH, sdAbs e polipeptídeos que contêm domínios VHH ou sdAbs podem ser produzidos usando fermentação microbiana usando métodos conhecidos na técnica e não requerem o uso de sistemas de expressão em mamíferos, como, por exemplo, fragmentos de anticorpos convencionais. Os domínios VHH e sdAbs são relativamente pequenos (aproximadamente 15 kDa, ou 10 vezes menores que uma IgG convencional) em comparação com os anticorpos convencionais de quatro cadeias e seus fragmentos de ligação ao antígeno e, portanto, mostram maior penetração nos tecidos (incluindo, mas não se limitando a tumores sólidos e outros tecidos densos) do que os anticorpos convencionais de quatro cadeias e seus fragmentos de ligação ao antígeno. Os domínios VHH e sdAbs podem mostrar as chamadas propriedades de "ligação à cavidade" (devido, por exemplo, a sua alça de CDR3 estendida) e podem acessar alvos e epítomos não acessíveis aos anticorpos convencionais de quatro cadeias e seus fragmentos de ligação ao antígeno. Foi demonstrado, por exemplo, que os domínios VHH e sdAbs podem inibir enzimas (WO 97/49805; Transue, T. et al., *Proteins*, 32:515-22, 1998; Lauwereys, M. et al., *EMBO J.*, 17:3512-20, 1998).

[0081] A expressão "anticorpo de domínio único" ou "sdAb", como usada aqui, é um anticorpo ou seu fragmento que consiste em um único domínio variável de anticorpo monomérico. Não está limitado a uma fonte biológica específica ou a um método específico de preparação. Um sdAb pode ser obtido, por exemplo, (1) pelo isolamento do domínio VHH de um anticorpo de cadeia pesada que ocorre naturalmente; (2) pela expressão de uma sequência de nucleotídeos que codifica um domínio VHH que ocorre naturalmente; (3) pela "humanização" de um

domínio VHH que ocorre naturalmente ou pela expressão de um ácido nucleico que codifique esse domínio VHH humanizado; (4) pela "camelização" de um domínio VH que ocorre naturalmente de qualquer espécie animal, em particular uma espécie de mamífero, como um ser humano, ou pela expressão de um ácido nucleico que codifique esse domínio VH camelizado; (5) pela "camelização" de um "anticorpo de domínio" ("Dab") ou pela expressão de um ácido nucleico que codifica esse domínio VH camelizado; (6) pelo uso de técnicas sintéticas ou semissintéticas para preparar polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão; (7) pelo preparo de um ácido nucleico que codifique um sdAb usando técnicas para a síntese de ácidos nucleicos, seguido pela expressão do ácido nucleico assim obtido; e/ou (8) qualquer combinação dos acima.

[0082] Os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão aqui descritos podem compreender, por exemplo, sequências de aminoácidos de domínios VHH que ocorrem naturalmente que tenham sido "humanizados", por exemplo, pela substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da sequência de VHH que ocorre naturalmente por um ou mais dos resíduos de aminoácidos que ocorrem nas posições correspondentes em um domínio VH de um ser humano.

[0083] Os polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão aqui descritos podem compreender, por exemplo, sequências de aminoácidos de domínios VH que ocorrem naturalmente que foram "camelizados", isto é, pela substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH que ocorre naturalmente com um ou mais dos resíduos de aminoácidos que ocorrem nas posições correspondentes no domínio VHH de, por exemplo, um anticorpo camelídeo. Isso pode ser realizado de uma maneira conhecida na técnica. Tal camelização pode ocorrer preferencialmente em posi-

ções de aminoácidos que estão presentes na interface VH-VL e nos chamados "Camelidae hallmark residues" (WO 94/04678). O domínio ou sequência de VH que é usado como uma sequência parental ou material de partida para gerar ou projetar a sequência camelizada pode ser, por exemplo, uma sequência VH de um mamífero e, em certas modalidades, a sequência VH de um humano. Deve ser notado, que tais sequências camelizadas podem ser obtidas de qualquer maneira adequada conhecida na técnica e, portanto, não estão estritamente limitadas a polipeptídeos que foram obtidos utilizando um polipeptídeo que compreende um domínio VH parental que ocorre naturalmente.

[0084] Ambas a "humanização" e a "camelização" podem ser realizadas pelo fornecimento de uma sequência de nucleotídeos que codifica um domínio VHH ou domínio VH que ocorrem naturalmente, respectivamente, e depois alterando, de uma maneira conhecida por aqueles versados na técnica, um ou mais códons na sequência de nucleotídeos de modo que a nova sequência de nucleotídeos codifique uma sequência humanizada ou camelizada, respectivamente. Com base na sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeos de um domínio VHH ou domínio VH que ocorrem naturalmente, uma sequência de nucleotídeos que codifique uma sequência humanizada ou camelizada desejadas pode ser projetada e sintetizada de novo usando técnicas de síntese de ácidos nucleicos conhecidas, após o que a sequência de nucleotídeos assim obtida pode ser expressa de uma maneira conhecida na técnica.

[0085] Em algumas modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao mesmo epítipo em C5 humano que o eculizumab, ou que se liga a um epítipo em C5 que impede a clivagem de C5 em C5a e C5b. Em algumas modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano, em que o poli-

peptídeo compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1-12 ou um fragmento das mesmas. Em outras modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1-12. Em outras modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica, pelo menos 96% idêntica, pelo menos 97% idêntica, pelo menos 98% idêntica ou pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-12. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 2 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 3 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 4 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 5 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 6 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 7 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em

outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 8 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 9 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 10 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 11 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 12 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela.

[0086] Em outra modalidade, é fornecido um polipeptídeo manipulado que se liga ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo manipulado consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NOS: 1-12 e seus fragmentos. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste em uma sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 3. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 4. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 5. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 6. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 7. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na

sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 8. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 9. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 10. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 11. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 12.

[0087] Em outra modalidade, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano, em que o polipeptídeo compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que a CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 13 - 17 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica às SEQ ID NOs: 13-17; CDR2 compreende uma sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 18 ou 19 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NOs: 18 ou 19; e CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 20 ou 21 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NOs: 20 ou 21.

[0088] Em outras modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, em que o polipeptídeo compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 22-34, ou um fragmento das mesmas. Em outras modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 22-34. Em outras modalidades, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, em que o polipeptídeo compreende uma

sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica, pelo menos 96% idêntica, pelo menos 97% idêntica, pelo menos 98% idêntico ou pelo menos 99% idêntico a qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 22-34. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 22 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 23 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 24 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 25 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 26 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 27 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 28 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 29 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 30 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 31 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descri-

ta na SEQ ID NO: 32 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 33 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado compreende a sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 34 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a ela.

[0089] Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 22-34 e seus fragmentos. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 22. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 23. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 24. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 25. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 26. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 27. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 28. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 29. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 30. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 31. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 32. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado

consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 33. Em outra modalidade, o polipeptídeo manipulado consiste na sequência de aminoácidos descrita na SEQ ID NO: 34.

[0090] Em outra modalidade, a descrição fornece um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, em que o polipeptídeo compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 35-43 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica às SEQ ID Nos: 35-43; CDR2 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 44-51 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica à SEQ ID: 44-51; e CDR3 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 52-63 ou uma sequência que é pelo menos 90% idêntica às SEQ ID NOs: 52-63.

[0091] O polipeptídeo manipulado aqui descrito pode se ligar especificamente, por exemplo, ao mesmo epítipo sobre a albumina sérica humana como Alb 1 (AVQLVESGGG LVQPGNSLRL SCAASGFTFR SFGMSWVRQA PGKEPEWVSS ISGSGSDTLY ADSVKGRFTI SRDNAKTTLY LQMNSLKPED TAVYYCTIGG SLSRSSQGTQ VTVSS; SEQ ID NO:149). Em outras modalidades, o polipeptídeo manipulado inibe competitivamente a ligação de Alb 1 à albumina sérica humana.

[0092] Quando o polipeptídeo manipulado compreende uma Ig, um fragmento adequado de Ig, tal como um domínio variável da Ig, também pode ser usado no lugar de uma Ig completa.

[0093] Os métodos para identificar CDRs a partir de um determinado domínio variável de imunoglobulina são conhecidos na técnica (Wu, T. & Kabat, E., *J. Exp. Med.* 132: 211-50, 1970; Clothia, C. *et al.*, *Nature*, 342: 877-83, 1989; Al-Lazikani, B. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273: 927-48, 1997; e Ofran, Y. *et al.*, *J. Immunol.* 181: 6230-35, 2008).

Proteínas de Fusão que se Ligam Especificamente ao componente C5

do Complemento e Albumina Sérica

[0094] São descritas aqui proteínas de fusão que compreendem polipeptídeos manipulados que se ligam especificamente à albumina e ao componente C5 do complemento, em que os polipeptídeos manipulados são fundidos diretamente ou estão ligados através de um ou mais ligantes ou espaçadores adequados. A expressão "ligante peptídico", como usada aqui, se refere a um ou mais resíduos de aminoácidos inseridos ou incluídos entre os polipeptídeos manipulados da(s) proteína(s) de fusão. O ligante peptídico pode ser, por exemplo, inserido ou incluído na transição entre os polipeptídeos manipulados da proteína de fusão a nível da sequência. A identidade e sequência dos resíduos de aminoácidos no ligante podem variar dependendo da estrutura secundária desejada. Por exemplo, glicina, serina e alanina são úteis como ligantes que possuem flexibilidade máxima. Qualquer resíduo de aminoácido pode ser considerado como um ligante em combinação com um ou mais outros resíduos de aminoácidos, que podem ser iguais ou diferentes do primeiro resíduo de aminoácido, para construir ligantes peptídicos maiores conforme necessário, dependendo das propriedades desejadas. Em outras modalidades, o ligante é GGGGAGGGGAGGGGS (SEQ ID NO: 102). Em outras modalidades, o ligante é GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 103). Ligantes peptídicos adicionais adequados para uso na criação de proteínas de fusão aqui descritas incluem, por exemplo, G₄S (SEQ ID NO:104), (G₄S)₂ (SEQ ID NO:105), (G₄S)₃ (SEQ ID NO:106), (G₄S)₄ (SEQ ID NO:107), (G₄S)₅ (SEQ ID NO:108), (G₄S)₆ (SEQ ID NO:109), (EAAAK)₃ (SEQ ID NO:110), PAPAP (SEQ ID NO:111), G₄SPAPAP (SEQ ID NO:112), PAPAPG₄S (SEQ ID NO:113), GSTSGKSSEGKG (SEQ ID NO:114), (GGGDS)₂ (SEQ ID NO:115), (GGGES)₂ (SEQ ID NO:116), GGGDSGGGGGS (SEQ ID NO:117), GGGASGGGGGS (SEQ ID NO:118), GGGESGGGGGS (SEQ ID NO:119), ASTKGP (SEQ ID

NO:120), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:121), G₃P (SEQ ID NO:122), G₇P (SEQ ID NO:123), PAPNLLGGP (SEQ ID NO:124), G₆ (SEQ ID NO:125), G₁₂ (SEQ ID NO:126), APELPGGP (SEQ ID NO:127), SEPQPQPG (SEQ ID NO:128), (G₃S₂)₃ (SEQ ID NO:129), GGGGGGGGGSGGGS (SEQ ID NO:130), GGGGSGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO:131), (GGSSS)₃ (SEQ ID NO:132), (GS₄)₃ (SEQ ID NO:133), G₄A(G₄S)₂ (SEQ ID NO:134), G₄SG₄AG₄S (SEQ ID NO:135), G₃AS(G₄S)₂ (SEQ ID NO:136), G₄SG₃ASG₄S (SEQ ID NO:137), G₄SAG₃SG₄S (SEQ ID NO:138), (G₄S)₂AG₃S (SEQ ID NO:139), G₄SAG₃SAG₃S (SEQ ID NO:140), G₄D(G₄S)₂ (SEQ ID NO:141), G₄SG₄DG₄S (SEQ ID NO:142), (G₄D)₂G₄S (SEQ ID NO:143), G₄E(G₄S)₂ (SEQ ID NO:144), G₄SG₄EG₄S (SEQ ID NO:145) and (G₄E)₂G₄S (SEQ ID NO:146). Aquele versado na técnica pode selecionar um ligante, por exemplo, para reduzir ou eliminar a modificação pós-traducional, por exemplo, glicosilação, por exemplo, xilosilação. Em certas modalidades, a proteína de fusão compreende pelo menos dois sdAbs, Dabs, anticorpos VHH, fragmentos de anticorpo VHH ou combinação dos mesmos em que pelo menos um dos fragmentos de anticorpo sdAbs, Dabs, VHH ou anticorpo VHH é direcionado contra a albumina e um dos fragmentos de sdAbs, Dabs, VHH ou anticorpos VHH são direcionados contra o componente C5 do complemento, tal que a proteína de fusão resultante seja multivalente ou multiespecífica. Os domínios ou porções de ligação podem ser direcionados contra, por exemplo, HSA, albumina sérica de macaco cynomolgus, C5 humano e/ou C5 de macaco cynomolgus.

[0095] Em algumas modalidades, o resíduo C-terminal do domínio de ligação à albumina da proteína de fusão pode ser fundido diretamente ou através de um peptídeo ao resíduo N-terminal do domínio de ligação do componente C5 do complemento. Em outras modalidades, o resíduo C-terminal do domínio de ligação do componente C5 do

complemento da proteína de fusão pode ser fundido diretamente ou através de um peptídeo ao resíduo N-terminal do domínio de ligação à albumina.

[0096] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão compreende uma ligação do componente C5 do complemento que compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-12 ou um fragmento dessas; e o polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana pode compreender uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 22-34 ou um fragmento das mesmas. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo é derivado de uma sequência de aminoácidos descrita em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1-12 e o segundo polipeptídeo é derivado de uma sequência de aminoácidos descrita em qualquer uma das SEQ ID NOs: 22-34. O domínio de ligação ao componente C5 do complemento humano pode compreender, por exemplo, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 ou 11, e o domínio de ligação à albumina pode compreender, por exemplo, a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26. Em outra modalidade, a descrição fornece uma proteína de fusão com qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 64-95. Em outra modalidade, a descrição fornece uma proteína de fusão com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. Em outra modalidade, a descrição fornece uma proteína de fusão com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 77. Em outra modalidade, a descrição fornece uma proteína de fusão com qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 96-101.

[0097] As proteínas de fusão aqui divulgadas podem ser produzidas pela expressão em uma célula hospedeira de pelo menos uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão. As células hospedeiras podem ter origem de mamíferos, plantas ou microbiana. Além de células

hospedeiras de mamífero conhecidas, células hospedeiras de levedura, por exemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e/ou células hospedeiras de plantas podem ser usadas.

Composições Terapêuticas que Compreendem Polipeptídeos que se Ligam Especificamente a C5 do Complemento ou Albumina Sérica ou suas Proteínas de Fusão e Administração das Mesmas

[0098] Em outra modalidade, a descrição fornece polipeptídeos manipulados que compreendem ou consistem em uma sequência de aminoácidos como aqui descrita. Em outra modalidade, a descrição fornece proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multi-específicas que compreendem ou consistem em pelo menos um polipeptídeo manipulado da descrição que está ligado a pelo menos uma porção terapêutica ou de direcionamento, opcionalmente através de um ou mais ligantes ou espaçadores adequados.

[0099] A descrição se refere ainda a usos terapêuticos dos polipeptídeos manipulados da descrição ou proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas que compreendem ou consistem em tais polipeptídeos manipulados ou a composições farmacêuticas que compreendem tais polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou multivalentes e proteínas de fusão multiespecíficas.

[00100] Em algumas modalidades, a porção terapêutica ou de direcionamento pode compreender, por exemplo, pelo menos um sdAb, Dab, VHH ou seus fragmentos. Em certas modalidades, o polipeptídeo manipulado da descrição é uma proteína de fusão multivalente e/ou multiespecífica que compreende pelo menos dois sdAbs, Dabs, anticorpos VHH, fragmentos de anticorpos VHH ou combinações dos mesmos.

[00101] Em algumas modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade por HSA maior que a afinidade pela albu-

mina sérica do rato. Em certas modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade pela albumina sérica de macaco cynomolgus maior que a afinidade pela albumina sérica de camundongo. Em outras modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade por HSA maior que a afinidade pela albumina sérica de macaco cynomolgus.

[00102] Em algumas modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade por C5 humano que é maior que a afinidade por C5 de camundongo. Em certas modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade por C5 de macaco cynomolgus que é maior que a afinidade por C5 de camundongo. Em outras modalidades, os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas mostram uma afinidade por C5 humano que é maior que a afinidade por C5 de macaco cynomolgus.

[00103] Os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritas podem exibir, por exemplo, propriedades terapêuticas aperfeiçoadas, incluindo, por exemplo, maior eficácia, biodisponibilidade, meia-vida ou outras propriedades terapêuticamente desejáveis quando comparadas à terapêutica com anticorpos ou outra terapêutica. Em uma modalidade, uma proteína de fusão da descrição compreende pelo menos um polipeptídeo manipulado aqui descrito e pelo menos uma porção terapêutica ou de direcionamento. Em tais proteínas de fusão, a proteína de fusão pode exibir, por exemplo, uma meia-vida aumentada em comparação com o domínio de ligação terapêutica sozinho. Geralmente, es-

sas proteínas de fusão têm uma meia-vida que é pelo menos 1,5 vezes, ou pelo menos 2 vezes, ou pelo menos 5 vezes, ou pelo menos 10 vezes, ou mais de 20 vezes maior do que a meia-vida da porção terapêutica ou de direcionamento correspondente por si só. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão da descrição tem uma meia-vida aumentada em mais de 1 hora, mais de 2 horas, mais de 6 horas ou mais de 12 horas em comparação com a meia-vida da porção terapêutica ou de direcionamento correspondente. Em outras modalidades, uma proteína de fusão tem uma meia-vida aumentada em mais do que 1 hora, mais do que 2 horas, mais do que 6 horas ou mais do que 12 horas, cerca de um dia, cerca de dois dias, cerca de uma semana, cerca de duas semanas, cerca de três semanas ou não mais do que 2 meses.

[00104] A expressão "meia-vida", como usada aqui, se refere ao tempo necessário para que a concentração sérica do polipeptídeo manipulado, proteína de fusão ou proteína de fusão multivalente e multi-específica seja reduzida em 50%, *in vivo*, como resultado, por exemplo, da degradação da molécula e/ou depuração ou sequestro da molécula por mecanismos fisiológicos. Os métodos para análise farmacocinética e determinação da meia-vida são conhecidos por aqueles versados na técnica na técnica.

[00105] Uma descrição geral de proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas que contêm um ou mais anticorpos VHH e a sua preparação é conhecida (Els Conrath, K. et al., *J. Biol. Chem.* 276: 7346-50, 2001; Muyldermans, S., *J. Biotechnol.* 74:277-302 2001; Publicações Internacionais WO 96/34103, WO 99/23221 e WO 04/041865.

[00106] Os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multi-específicas aqui descritas podem ser expressas ou associadas a construções que incluem, por exemplo, um ou mais elementos, tais como vetores de expressão (WO

04/041862).

[00107] Os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos podem ser expressas em, por exemplo, células hospedeiras isoladas que compreende moléculas de ácido nucleico que codificam os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos. As células hospedeiras adequadas incluem, mas não estão limitadas a células de mamíferos e leveduras.

[00108] As composições terapêuticas ou farmacêuticas aqui descritas podem compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas, como aqui descritos em mistura com um agente de formulação farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável selecionado para adequação ao modo de administração. Os materiais de formulação aceitáveis são preferivelmente não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações a serem empregadas.

[00109] Materiais de formulação aceitáveis podem ser utilizados para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, limpidez, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Os materiais de formulação aceitáveis incluem, entre outros, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina), antimicrobianos, antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogênio sulfito de sódio), tampões (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos), agentes de volume (como manitol ou glicina), agentes quelantes (como ácido etilendiamina tetra acético (EDTA)), agentes complexantes (como cafeína, polivinilpirrolidona), beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monossacarídeos, dissacarídeos e outros car-

boidratos (como glicose, manose ou dextrinas), proteínas (como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas), corantes, aromatizantes e agentes diluentes, emulsificantes, polímeros hidrofílicos (como polivinilpirrolidona), polipeptídeos de baixo peso molecular, contra-íons formadores de sal (como sódio), conservantes (como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio), solventes (como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol), álcoois de açúcar (como manitol ou sorbitol), agentes de suspensão, tensoativos ou agentes umectantes (como Pluronic; PEG; ésteres de sorbitana; polissorbato tais como polissorbato 20 ou polissorbato 80; triton; trometamina; lecitina; colesterol ou tiloxapal), agentes para melhorar a estabilidade (como sacarose ou sorbitol), agentes para aumentar a tonicidade (como halogenetos de metais alcalinos - de preferência cloreto de sódio ou potássio - ou manitol sorbitol), veículos para liberação, diluentes, excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos {ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18ª Ed., AR Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990) e edições subsequentes do mesmo, que são aqui incorporadas por referência).

[00110] Um especialista na técnica pode desenvolver uma composição farmacêutica que compreenda os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritas, dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de liberação e dosagem desejada.

[00111] Uma vez que os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos podem exibir, por exemplo, uma meia-vida aumentada, eles podem, em algumas modalidades, ser administrados para estar em circulação. Como tal, eles podem ser administrados de qualquer maneira

adequada, como intravenosa, subcutânea, através de injeção ou infusão, ou de qualquer outra maneira adequada que permita que os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão ou proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas entrem na circulação. A preparação de tais composições farmacêuticas está dentro do conhecimento daquele versado na técnica.

[00112] Qualquer um dos polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos, pode ser administrado em combinação com uma terapia adicional, isto é, combinado com outros agentes. A expressão "coadministrado", conforme aqui utilizado, inclui toda ou qualquer administração simultânea, separada ou sequencial dos polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos com adjuvantes e outros agentes, incluindo a administração como parte de um regime de dosagem.

[00113] As composições farmacêuticas aqui descritas podem incluir um ou mais agentes para melhorar, por exemplo, a liberação do agente terapêutico. Agentes adicionais podem ser coadministrados, por exemplo, como co-injetável. Os agentes que degradam o hialuronano, por exemplo, podem ser incluídos nas composições farmacêuticas aqui descritas ou tais agentes podem ser coadministrados com as composições farmacêuticas aqui descritas para facilitar, por exemplo, a dispersão e absorção dos agentes terapêuticos aqui descritos após a administração. Um exemplo de um tal agente é a hialuronidase recombinante.

[00114] As composições farmacêuticas também podem ser selecionadas para administração parenteral. Alternativamente, as composições podem ser selecionadas para inalação ou liberação através do trato digestivo, tal como por via oral. A preparação de tais composições farmacêuticas está dentro do conhecimento aquele versado na

técnica.

[00115] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para aqueles versados na técnica, incluindo formulações que envolvem formulações de liberação sustentada ou liberação controlada. As técnicas para formular formulações de liberação sustentada ou liberação controlada, utilizando, por exemplo, veículos lipossomais, micropartículas biodegradáveis ou esferas porosas e injeções de depósito, são conhecidas daqueles versados na técnica.

[00116] A descrição também abrange kits terapêuticos que compreendem os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritos. Em algumas modalidades, os kits compreendem um primeiro recipiente com uma proteína seca e um segundo recipiente com uma formulação aquosa. Em outras modalidades, os kits compreendem seringas pré-cheias simples e com várias câmaras (por exemplo, seringas com líquidos e lyosyringes).

[00117] A descrição também abrange um artigo de fabricação que compreende um recipiente que compreende um rótulo e uma composição que compreende os polipeptídeos manipulados, proteínas de fusão e proteínas de fusão multivalentes e multiespecíficas aqui descritas, em que o rótulo indica que a composição deve ser administrada a um paciente que possui ou que é suspeito de ter um distúrbio mediado pelo complemento.

[00118] Em uma modalidade, a descrição fornece um método para prevenir e/ou tratar pelo menos uma doença, condição ou distúrbio que pode ser prevenido ou tratado usando um polipeptídeo manipulado, proteína de fusão ou proteína de fusão multivalente e multiespecífica aqui descritos, a método compreendendo a administração a um paciente necessitado uma quantidade terapêuticamente ou farmacêuticamente eficaz de um polipeptídeo manipulado, proteína de fusão ou

proteína de fusão multivalente e multiespecífica aqui descritos. Em modalidades particulares, o distúrbio é um distúrbio mediado por complemento, tal como, por exemplo, artrite reumatoide; nefrite lúpica; asma; lesão de isquemia-reperfusão; síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS); doença de depósito denso (DDD); hemoglobinúria paroxística noturna (PNH); degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada à idade (AMD)); hemólise, síndrome com enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas (HELLP); síndrome de Guillain-Barré (GBS); enteropatia com perda de proteína (por exemplo, Síndrome de CHAPLE); miastenia gravis (MG); neuromielite óptica (NMO); microangiopatia trombótica pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (pós-HSCT-TMA); TMA pós-transplante de medula óssea (TMA pós-BMT); Doença de Degos; Doença de Gaucher; glomerulonefrite; púrpura trombocitopênica trombótica (TTP); perda fetal espontânea; vasculite imune de Pauci; epidermólise bolhosa; perda fetal recorrente; esclerose múltipla (MS); traumatismo craniano; e lesão resultante de infarto do miocárdio, circulação extracorpórea e hemodiálise.

[00119] A quantidade eficaz de uma composição farmacêutica como aqui descrita para ser empregada terapêuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e objetivos terapêuticos. Um especialista na técnica compreenderá que um nível de dosagem apropriado para o tratamento variará dependendo, em parte, da molécula a ser administrada, da indicação para a qual a composição está sendo usada, da via de administração e do tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e condição (idade e estado geral de saúde) do paciente.

EXEMPLOS

[00120] Os Exemplos a seguir são ilustrativos de modalidades específicas da descrição e vários usos dos mesmos. Eles são estabele-

cidos apenas para fins explicativos e não devem ser interpretados como limitantes do escopo da invenção de forma alguma.

Exemplo 1. Imunização de lhama e construção de biblioteca de fagos anti-VHH de C5

[00121] As imunizações de lhama foram realizadas começando com uma injeção primária seguida de reforços secundários. Resumidamente, a imunização primária foi iniciada com 500 µg de proteína C5 do complemento humano e reforços subsequentes de 500 µg de antígeno de proteína C5 do complemento humano foram administrados na semana 2 (reforço 1), semana 4 (reforço 2), semana 8 (reforço 3) e semana 12 (reforço 4). Os títulos séricos foram medidos por ELISA e os títulos após o reforço 3 foram encontrados serem os mais elevados -10 vezes acima do sinal pré-sangramento na diluição 1:1.000.000. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de amostras de sangue após o reforço 3. A viabilidade celular foi encontrada ser de 98% pela coloração com trypan blue. As células foram lisadas em tampão de lise de RNA imediatamente após o isolamento de PBMC. O RNA total foi isolado de PBMCs e o cDNA foi sintetizado usando iniciadores específicos da cadeia pesada de lhama. Os fragmentos de VHH (somente cadeia pesada) foram separados dos fragmentos de VH (cadeia pesada convencional) por eletroforese em gel. Os fragmentos de VHH foram clonados em pADL-10 (Antibody Design Labs, San Diego, CA) e a biblioteca de DNA foi transformada em células TG1. 114 colônias foram sequenciadas aleatoriamente e 101 (89%) sequências corretas foram obtidas. A biblioteca foi raspada e suspensa em glicerol 25% e depois armazenada a -80°C.

Exemplo 2. Seleção em apresentação de fago e rastreamento de domínios VHH de C5

[00122] As células TG1 contendo a biblioteca anti-domínio VHH da proteína C5 do complemento humano foram cultivadas até a fase loga-

rítmica (OD₆₀₀ = 0,4-0,8) a 37°C em meio 2xYT contendo carbenicilina 100 µg/mL e glicose 2%. As células foram infectadas com fago auxiliar M13K07 com e sem agitação a 37°C por 30 minutos. As células infectadas foram peletizadas a 4000 x g por 10 minutos e ressuspensas em meio 2xYT contendo carbenicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL e IPTG 1 mM e o bacteriófago foi propagado pelo crescimento durante a noite a 30°C e 250 rpm. A cultura noturna foi centrifugada a 9000 x g por 10 minutos a 4°C e o fago foi precipitado com um quinto do volume de uma solução de PEG-NaCl [polietilenoglicol 6000 20%, NaCl 1,5 M] pela incubação por 1 hora em gelo. As partículas do fago foram peletizadas por centrifugação a 9000 x g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As partículas de fago foram ressuspensas em tampão de bloqueio superbloc e os resíduos celulares foram peletizados por centrifugação por 10 minutos a 7500 x g em um tubo de microcentrífuga. O sobrenadante contendo as partículas de fago foi transferido para um novo tubo e o fago foi precipitado novamente como descrito acima. As partículas de fago concentradas foram submetidas a um desafio térmico por 1 hora a 70°C e o título do fago antes e após o aquecimento foi determinado pela infecção de células TG1 em fase logarítmica, seguida de plaqueamento em placas de agar 2xYT com carbenicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL e glicose 2%.

[00123] A estratégia de seleção da biblioteca incluiu a seleção com a proteína C5 do complemento biotilado de macaco cynomolgus (cyno) e a competição com o equivalente molar da proteína C5 do complemento humano não biotilada para obter domínios VHH anti-C5 com afinidade combinada para ambas as espécies humanas e cyno. A biblioteca de apresentação em fago de VHH foi submetida a uma etapa de desmarcação contra Dynabeads® M-280 Streptavidin por 1 hora em temperatura ambiente. As partículas de fago desmarca-

das foram selecionadas por afinidade combinada com C5 humano e de cyno pela incubação em uma solução equimolar de C5 biotinilado de cyno e C5 humano não biotinilado com Dynabeads M-280 Streptavidin por 30 minutos em temperatura ambiente. Após 5 ciclos de lavagem com PBST e PBS, o fago foi eluído das esferas utilizando glicina 0,1 M (pH 2,2) com BSA 1 mg/mL. O sobrenadante eluído foi neutralizado com Tris 1 M, pH 8,0. As células TG1 em fase logarítmica foram infectadas com o fago neutralizado e plaqueadas em meio 2YTCG para medir o título de saída. Os títulos de saída e entrada foram comparados para calcular a taxa de enriquecimento; uma proporção mais alta sugeriu o isolamento bem-sucedido de clones específicos de C5.

[00124] Os clones individuais foram coletados, inoculados em uma placa de 96 poços profunda em meio 2xYT com carbenicilina 100 µg/mL e glicose 2% e cultivados até a fase logarítmica. As células foram infectadas com M13K07 e cultivadas durante a noite a 30°C para a produção de partículas de fago que apresentem domínios individuais de VHH no sobrenadante da cultura. O rastreamento por ELISA de fagos de quatro placas de 96 poços com C5 humano capturado em placas revestidas com estreptavidina sugeriu ~60% de clones positivos. 72 clones únicos de um total de 76 foram selecionados como representantes com base na análise de sequência da CDR H3. As sequências desses clones de VHH representativos são fornecidas na Tabela 1. Para fins de clonagem, os aminoácidos N e C-terminais foram modificados para coincidir com os aminoácidos N e C-terminais de VH-3 linha germinativa humana.

[00125] As sequências de aminoácidos adequadas para uso nos polipeptídeos manipulados da descrição incluem as sequências de aminoácidos descritas na Tabela 1 ou seus fragmentos.

Tabela 1. Domínios VHH anti-C5 derivados de lhama e se cada clone se liga à proteína C5 do complemento humano (hC5) e/ou proteína C5 do complemento de cyno (cC5).

	Sequência	Liga a hC5	Liga a cC5
LCP0081	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASTSGSDFSGKKMAWYR-QAPGNQREFVAIIFSNKVTDYADSVKGRFTISRDN-NAKKTVYLQMSLTPDTAVYYCHDQEISWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:150)	+	-
LCP0082	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTSVINSMGWYR-QAPGKQRELVATIDLSGTTNYADSAQGRFTISRDN-NAENLNLVYLQMNLNLPDDTAVYYCNALLSRAVSGSYVY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:151)	+	+
LCP0083	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRTISNIDLNMWYR-QAPGKQREFVASLQSNATNYADSVKGRFTISRDN-NTLFLQMNSLNPEDTAVYFCHALLPRSPYNSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:152)	+	+
LCP0085	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASSIIPNIYAMGWYR-QAPGKQRELVASIEGLPANYADSVKGRFTISRDN-NTVFLQMHSLSKSEDTAVYYCYAFRPGVPTTWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:153)	+	+
LCP0086	EVQLVESGGGLVQAGSLRLSCAASGISAINAMGWYR-QAPGKQREFVADITRAGVSDYADAVKGRFTISRDN-NTFYLQMNDLKPEDTAVYYCDALLIAGGVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:154)	+	-
LCP0088	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTVMGWFR-QAPGKEREVAA-VHWGDGNTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVYLQLNYLK-PEDTSVYYCAARPPTYVGTSRNSRSYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:155)	+	+
LCP0089	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVVSRAIDRNAMGWFR-QAPGKERESVAAISASSGNTYYSDSVTGRFTISRDN-NTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGSRGSWYLFDR-REYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:156)	+	-
LCP0090	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCTASETSFDINVMGWYR-QAPGKQRELVAIITASGNTEYADSAKGRFTISRDN-NTKNTVAMQMNNLKPDDTAVYYCYVLLSGAVSGVYAH-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:157)	+	+
LCP0091	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASGRTDSRYAMGWFR-QAPGKERELMAAISWSGRPTYADSVKGRFTISRDN-NTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAYKRLPAWYTG-SAYYSQESEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:158)	+	+
LCP0092	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRTISNIDLNMWYR-QAPGKQREFVASLQSTGTTDYADSVKGRFTISRDN-NTLFLQMNSLNPEDTAVYYCHALIPRSPYNVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:159)	+	+
LCP0095	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTISTVMWFR-QAPGKEREVAAADHWGDAGTVYADSVKGRFTISRDN-NTVYLQMNLYLKPEDTSVYYCAARPPTYVGTSRDSRAY-DYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:160)	+	+
LCP0097	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEISSDPMWYR-QAPGKQREMVARILPIGPPDYADAVKDRFSISRENAK-NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNLLHPLSGLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:161)	+	+
LCP0098	EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCVASRSIS-SAMNWYRQPPGKQRELVALITRGFNTNYADSVKGRFTISRDN-NAKNTVYLQMNSLKPEDTGYYCNSLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:162)	+	-
LCP0100	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTDSMWSMGWFR-QAPGQEREVAAISWSVGTYYEDSVKGRFT-LSRDDDKDTAYLEMSDLKLEDTADYYCAASTRHGTNLVLPDYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:163)	+	-
LCP0101	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRTISNIDLNMWYR-QAPGKQREFVASLQSTGTTDYADSVKGRFTISRDN-NTLFLQMNSLNPEDTAVYYCHALLPRSPYNAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:164)	+	+
LCP0102	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIIPNIYAMGWYR-QAPGKQRELVASIEGGSTNYADSVKGRFTISRDN-NTVFLQMHSLSKSEDTAVYYCYAFRPGVPTDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:165)	+	+

LCP0103	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLCVASGRFTSNYRMGWFRQAP-GAEREFVGTIYWSTGRSYYGDSVKGRFISGDNAK-NTIHLQMNSLKPEDTGVYYCASGPENSAFDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:166)	+	+
LCP0104	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCLASGRPFSSYTMGWFR-QAPGKERDFVATISWGGIKYYADSVGRFISRDNAK-NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATELRTWSRQT-FEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:167)	+	-
LCP0105	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRFTISTVMWFR-QAPGKEREFVAAVHWGDESTVYADSVKGRFTISRDNAK-NTVYLQMNYLKPEDTSVYYCAARPPTYVGGSSRSRAY-DYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:168)	+	+
LCP0106	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVSVGSILDINVMWYR-QAPGKQREFVARITSGGDIDYADPVKGRFTIST-NGAKNTVYLQMNSLKPEDTAAYYC-NVLLSRSSAGRYTHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:169)	+	+
LCP0111	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFPFLYDMGWYR-QAPEKQRESVAITQSGSTDYADSVKGRFTISRDNAK-NTLYLQMNSLKPEDTAVYYCRLVGVTVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:170)	+	-
LCP0112	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLCASGRFTSSYGIGWFR-QAPGKEREFVAAISRTGQTHYADSRFTISRDNAK-NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARTGGPIYGS-EYHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:171)	+	-
LCP0113	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCLASGRPFSSLTMGWFR-QAPGKQREFVATTSWSDIKYYADFKVGRFTISRDNAK-NMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAATLLRTWSRQTNEYEY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:172)	+	-
LCP0114	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSRIGTISNIDLMNWYR-QAPGKQREFVASLQSTGTTDYADSVRGRFTISRDNAK-NTLFLQMNSLNPEDTAVYYCHALLPRSPYNVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:173)	+	+
LCP0115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRFTSGILSPYAVGWFR-QAPGKQREFVSTITSGGSAIYDTSVKGRFTLSRD-NAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRTR-RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:174)	+	+
LCP0122	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRFTGATINVMWYR-QAPGKQRELVARVAIDNNTDYADHAKGRFTISRDNKNTKNTVYLQMNNLKPDDTAVYYCNVLLSRQIS-GSYGHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:175)	+	+
LCP0123	EVQLVESGGGLVQAGGSLTLCASMSGTRPFEDYVMWFR-QATGKEREFVATITWMGETTYKDSVNGRFAISRDNKNAENTVALQMNSLEPEDTAVYFCAHSRSSFSTSGGRYNPRPT-EYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:176)	+	+
LCP0125	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRFTISTVMWFR-QAPGKEREFVAAVHWGDEGTVYADSVKGRFTISRDNAK-NTVYLQMNSLKPEDTSVYYCAAKPPTYVGTSSRSRAYVY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:177)	+	+
LCP0126	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCLASGSGFSINVMWYR-QAPGKQRDLVASMTIGGRNTYKDSLKGRFTISRDNKNTKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCYALLDRGIGGNYVY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:178)	+	+
LCP0127	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGLTFSDYYMGWFR-QAPGKERDFLARIGKSGIGKSYADSVRGRFTISRDNAK-NTVYLQMNNLKLDTAVYYCAA-DRDIAYDARLTAEYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:179)	+	+
LCP0128	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRFTISTVMWFR-QAPGKEREFVAAVHWGDESTVYADSVKGRFTISRDNAK-NTVYLQMNYLKPEDTAVYYCAARPPTYVGTSSRSRAY-DYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:180)	+	-
LCP0129	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASVASETIVSINDMAYR-QAPGKQRELVASITIHNNRDYAD-SAKGRFTISRDDTKNTVYLQMTHLKPDDTAVYYC-TVLLSRALSGSYRFWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:181)	+	+
LCP0130	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGTFININVMWYR-QAPGKQRELVAIMDIGTTDYADSVKGRFTISRDNAK-NTVYVQMNNLKSSEDVAVYYCYCALDRA-VAGRYTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:182)	ND	ND
LCP0132	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGSLNDYNMGWFR-QAPGKDREIVAALSRRSHGIYQSDSVKYRFSISRDNKNTKNNVSLQMDSLPEPEDTAVYYCAADGDPYFTGRDMNPEY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:183)	+	-
LCP0133	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCLASGGRFSDYGMW-	+	+

	FRQGPGEREFVSRISGNRGTQYTDVSVGRFIISRDND-KNTVYLQMNLDKVEDTAIYYCARGSGPSS-FNEGSVYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:184)		
LCP0134	EVQLVESGGGLVQSGGSLTLCVLSGSIFSSNTMGWHR-QAPGKQREWVAITTSGGTTKYADSVKGRFTISRDNKNTVYL-RMNNLKPEDTGVYFCYASLAGIWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:185)	+	+
LCP0135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSAAPE-TEATYNVMGWYRRAPGKQRELVAATMTI-DYNTNYADSAKGRFTISRDNKNTVYLQMNLRPDDTAVYYCRVDLSRQIS-GSYNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:186)	+	+
LCP0136	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSQAISGFAFTDVGMSWVR-QAPGKLEWVSSISSGSSITTYSDSVKGRFTISRDNARNTLFLQMNSLKPEDTAVYYCGRYCTGLGCHPRRDSAL-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:187)	+	+
LCP0137	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCRASGFTYSTAAMGWVR-QAPGKLEWVSSISSLGS DRKSADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNSLKPEDTAVYYCARFISNRWSDVHAPSDFGSRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:188)	+	+
LCP0138	EVQLVESGGGSLVQAGGSLRLSAAFGFTDNYAIWFR-QAPGKEREVSVCLSTNDGETYYADSVKGRFTISSDHAK-NTVYLQMDSLRPEDTAVYYCAAAGSWCHKYEDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:189)	+	-
LCP0139	EVQLVESGGGLVQAGESLRLS-CAASGRTSDLYVVGWFRQTPGKEREFVAGIAWTGDASY-YADSVGRFTIARDNAENRIDLQMTSLKPEDTAVYYCA-ADSRARFERQRYNDMNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:190)	+	-
LCP0141	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCIASVTIADINVMGWYR-QAPGKQREFVASIPTTGDKNYAESAKGRFTISRDNQNTVAMQMNNLKPDDTAVYYCYVLLSRAVSGSYGHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:191)	+	+
LCP0142	EVQLVESGGGLVQVGGSLRLSQAASGSIVDIKVMGWYR-QAPGNERELVALINDADDSEYSPSMRGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAAAYCAADRDSWFKSPYIPG-SWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:192)	+	+
LCP0143	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSQAAPMGATINVMWYR-QAPGKQRELVARLPLDNNIDYGFADKGRFTISRDNTRNTVYLQMNNSLKPDDTAVYYCNVLLSRQINGA-YVHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:193)	+	+
LCP0144	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSQAASGIDGDMVMWYR-QAPGKQRELVASITIGGNTNYADSVKGRFTIARDNAK-NRMSLEMNSLKS EDTAVYYC-NTLLSRVHDGQYVFWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:194)	+	+
LCP0145	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASEDAFKDTLWFR-QAPGEEREFVAAFVWAGGPFYADSVKGRFTISMDEDRTVYLQMNNSLKPEDTGVYYCAASLRLRVGEIT-PRHMNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:195)	+	-
LCP0146	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSQAASGRAFSDYAMWFR-QAPGKEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSKDNK-NRMSLQMNNSLKPEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:196)	+	+
LCP0147	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSQAASGRTFSSSNMGWFR-QAPGEEREFVTAIDWSSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLK-PEDTAVYYCAAQGSGLDWGYPWTYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:197)	+	+
LCP0149	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGSVLNIDSMWYR-QAPGKQRELVAEMLWGGTKNYGDSVKGRFTISGDADWGTEL-QMSSLKPEDTAVYYCNAVGRGFRDAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:198)	+	-
LCP0150	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSGFGILDMGWYR-QAPGSRRELVGYYVTRDGTNYGNSVKGRSIISE-DITKNTVILQMNNSLKPEDTAVYFCTAGLT-NQPRAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:199)	+	+
LCP0151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS-CAASGSVSSINVMGWYRQTPGKQRELVA- INRGGSTNVADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNNSLKPEDTAVYYCNAEPYGLDWRYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:200)	+	+
LCP0152	EVQLVESGGGLEQAGGSLRLSC-TASGGTDSIYQMGWFRQTPGKEREFVAAINWNY-GGAYYPDSVKGRFTISRDKAKNIGFLQMNNSLKPEDTAVYY-	+	-

	CATSQTSVDAFSPITTARRYQYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:201)		
LCP0153	EVQLVESGGGLVQAGGSLTSCVASGRFTFSNYRMGWFR-QAPGKEREVGTIYWSTGRSYYGDSVKGRFIISGDNAK-NTIHLQMNSLKPEDTGVYYCASGPEMSAFDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:202)	+	+
LCP0154	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFR-QAPGKEREVGVSCISSDGGSTYYGDSVKGRFTISRDNK-NTMYLQMNSLKPEDTAVYYCATGTPPLSSYYGSCLDYDMAY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:203)	+	+
LCP0155	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTFSSNYGMAWFR-QAPEKEREVARISSNGRRTEYADGVSGRFTISRDNK-NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCARAAGPSGF-HEQSIYDDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:204)	+	+
LCP0295	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRSISTYVAG-WFRQPGKEREVVALISRGGGDIQYSDSVKGRFTISRDNK-NAVYLMNSLKPADTAVYYCSDLASFGS-RLVSRWDYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:205)	+	+
LCP0296	EVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWFR-QAPGKEREVVASISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNK-KNAVYLRMNSLNAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSY-GYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:206)	+	+
LCP0297	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTSDDYAIWFR-QAPGKEREVGVSCIGSGDGTYYADSVKGRFIIS-SENAKKTVYLMNSLKPEDTGIYYCAADLYPPADYALD-HTWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:207)	+	+
LCP0298	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVSVSGS-RFSLDTVGWHHQAPGKLRREL-VARIRDDGDMYVASVKGRFIISRDDAKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCYFSRNGAWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:208)	+	+
LCP0299	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGASGRISDINVMGWYR-QAPGKQREMVADIDIRGYTNYADSVKGRFTVSRDNAETMYL-EMNSLKPEDTAVYRCNALTSRDWGTGKYVYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:209)	+	+
LCP0300	EVQLVESGGDLVQVGGSLRLS-CAFPGSMSSRNSVNWYRQPPGKQREWVATISVSGFTQYAD-SAKGRFTISRDSAKNTVHLQMNSLKPEDTGVYYC-NYMDYWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:210)	+	+
LCP0301	EVQLVESGGGVVRRAGGSLKLSCTAAGTDINIVTGWHR-QAPGKHRELVATIVGSGSRTNYADSVKGRFTISRDNK-KNTVYLMNSLKPEDTAVYYCYATSIGWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:211)	+	+
LCP0302	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSFGILSAYAVGWFR-QAPGKEREVSTITSGGSTLSADSVKGRFTLSRD-NAKDTVYLMNSLKPEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:212)	+	+
LCP0303	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCTASGNVRSIFTMAWYR-QAPGKQRELVASAAKGGDTYYADSAKGRFTISRDDA-KAIVSLQMNSLKPEDTAVYYCKTDGRPWF-SEDIYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:213)	+	+
LCP0304	EVQLVESGGGLVQVGDMSRLSCAVFGNIFTRD-PVMWFRQPPGKQREWVATITPSGFAN-YADSVKGRFTISRYYAANNTVHLQMNSLKPEDTGVYFCNFGTYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:214)	+	+
LCP0306	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASKGAFNINVMWYR-QAPGKQRELVARVALGGTTDYADSVKGRFTISR-NAQDTVYLMNSLKPEDTAVYYCNVLLDRGVRGSYAY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:215)	+	+
LCP0309	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYSSYVIGWFR-QAPGKEREVVASIRWAGGDSHYQESVKGRSTI-SKDNARNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAGAAPVPGQSYEWSSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:216)	+	+
LCP0310	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSFAFVYVGPMAWYR-QAPGKERESVASITKGGITNYADSVKGRFTISRDNK-NTVYLMNSLKPEDTAVYYVCNAR-VKLQEDRLFRDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:217)	+	+
LCP0311	EVQLVESGGGMVQPGGSLRLSCVSGASGNIDFVTGWHR-QAPGKHREMVAVITGDGTRNYRDSVKGRFSISRDNK-NTIYLMNSLKPEDTAVYYCYMSNPISWGGGTQVTVSS (SEQ ID NO:218)	+	+
LCP0312	EVQLVESGGGLVQAGGSRRLSCAVSRTLSSFGMGWFR-QAPEKPREFVAITWGQGGTFYADSVKGRFTISRDIV-	+	+

	KNTVYLQMNLDLKPDDTGLYFCVSAPHFHEAFPSRPPAYAY-WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:219)		
LCP0313	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYGSYVIGWFR-QAPGKEREFVASIRWAGGDSHYGDPLKGRSTISKDNAK-NTVYLQMNLSLKPEDAA-VYYCAGAAPVPGSSYEWNTNWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:220)	+	+
LCP0314	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSVNTMGWYR-QAPGKQRELVAFITSGDDTNYADSMKGRFTISRDNNAK-NTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCVATLGRSSSGTY-TYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:221)	+	+
LCP0316	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASLRITLDNY-GVGFWRQTPGREREFVSAVSWNGDRTYQDSVKGRFTIS-REYAKNTVYLQMDLSLKPEDTAVYYCAVNMYGSTFPGLS-VESHYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:222)	+	+
LCP0317	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIIFSINAMAWYR-QAQQKQRELVAADITKNDITDYADSVKGRFTIARDNAK-NTVDLQMNLSLKPEDTAVYYCTAALSHPYRSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:223)	+	+
LCP0319	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGRSLSDY-YIIWFRQPPGKEYEFVSSIRWNTGTTYGDSVKGRFTISRDNASTVYLQMNLSLKPEDTALYWCAA-GLHLTPTSRTYNYRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:224)	+	+
LCP0320	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPETIFTINSMGWYR-QAPGKQRELVAFINLDGNTNYADSAKGRFTISRDN-NAENTVYLQMDNLDLKPDDTAVYYCNVLLSRAISGSYV-HWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:225)	+	+

Exemplo 3. Clonagem e expressão de domínios VHH anti-C5

[00126] Os domínios VHH anti-C5 representativos foram subclonados em um vetor de expressão em mamíferos e expressos como fusões de VHH-His-tag em células Expi293F. Os sobrenadantes da cultura foram coletados quando a viabilidade celular caiu para 50-60%. Os sobrenadantes foram analisados através de SDS-PAGE sob condições redutoras, seguidos por coloração com Coomassie brilliant blue. Os níveis de expressão foram calculados usando interferometria de camada biológica em um instrumento Octet (ForteBio Inc.). Os domínios VHH marcados com His foram purificados por Cromatografia de Afinidade em Metal Imobilizado (IMAC) em um AKTA (GE Healthcare) a partir dos sobrenadantes da cultura.

Exemplo 4. Análise funcional e de ligação de domínios VHH anti-C5

[00127] Análise de ligação ao componente C5 do complemento. Os domínios VHH anti-C5 representativos foram sequenciados, caracterizados e avaliados quanto à ligação à proteína C5 humana, de macaco cynomolgus (cyno) e de camundongo usando a Biolayer Interferometry em um instrumento Octet (ForteBio Inc.). Os sobrenadantes da cultura celular dos domínios VHH-His expressos foram normalizados para

uma concentração de 20 µg/mL em 2x tampão cinético e carregados em pontas de biossensores anti-penta-HIS (HIS1K) (ForteBio Inc.) por 300 segundos para saturar completamente as pontas dos sensores. As pontas saturadas foram então expostas a uma solução contendo 50 nM de C5 solúvel (humano, cyno ou camundongo) em 2x tampão cinético cada um por 600 segundos em experiências separadas e a dissociação foi seguida por 600 segundos em 2x tampão cinético. Os domínios VHH que mostraram ligação a C5 humano (hC5) ou C5 cyno (cC5) estão marcados com um '+' na Tabela 1.

[00128] Ensaio de hemólise para o antagonismo de C5. Um ensaio de hemólise mede a liberação de hemoglobina de eritrócitos de frango sensibilizados, lisados pela exposição ao soro ativado pela Via Clássica do Complemento CCP. Os domínios VHH marcados com His foram expressos em células Expi293. Ensaios preliminares foram utilizados para selecionar domínios VHH anti-C5 funcionais, que foram purificados por IMAC. Dez domínios VHH purificados foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a hemólise mediada por CCP de eritrócitos de frango sensibilizados em diferentes concentrações.

[00129] Nenhum anticorpo e EDTA 20 mM foram utilizados como controles com lise completa e sem lise para o ensaio, respectivamente. Os dez domínios VHH e as IgGs anti-C5 de controle (indicadas como h5G1.1, BNJ441 e Ec-CHO) em diferentes concentrações (32 µg/mL a 0,5 µg/mL) foram pré-incubados com soro humano normal (NHS) 20% em 0,1 mL de salina tamponada com gelatin veronal (GVB ++, cat # B100, Comptech) por 30 minutos em temperatura ambiente. 400 eritrócitos de frango (Lampire Biologicals, cat. # 7201403) foram lavados quatro vezes com 1 mL de GVB++ e os cRBCs sensibilizados foram preparados pela incubação de 5×10^7 células/mL com diluição 1:500 (v/v) de IgG de frango anti-coelho (cat # 203-4139, Rockland) e incubados a 4°C por 15 minutos. As células foram lavadas duas vezes

com GVB++ e ressuspensas em um volume final de 3,6 mL de GVB++. 30 µL de cRBCs sensibilizados ($2,5 \times 10^6$ células) foram adicionados ao soro e anticorpos humanos pré-incubados e incubados a 37°C por 30 minutos. As células foram peletizadas por centrifugação a 1700 x g por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante (85 µL) foi transferido para uma nova placa de 96 poços de fundo plano. A absorbância foi medida a 415 nm. O percentual de lise foi calculado para cada domínio VHH e os anticorpos de controle como:

$$\left(\frac{A_{415\text{amostra}} - A_{415\text{sem lise}}}{A_{415\text{lise completa}} - A_{415\text{sem lise}}} \right) \times 100$$

onde $A_{415\text{amostra}}$ é a absorbância a 415 nm para o anticorpo da amostra, $A_{415\text{sem lise}}$ é a absorbância a 415 nm para o controle sem lise (EDTA 20 mM) e $A_{415\text{lise completa}}$ é a absorbância a 415 nm para o controle completo da lise. Os resultados são mostrados na figura. 1

[00130] Identificação de domínios VHH que inibem a liberação de C5a. Clivagem da proteína C5 humana (por exemplo, liberação de C5a com a Complement Alternative Pathway C5 convertase depositada em CAP-activator Zymosan) foi medida utilizando um imunoensaio baseado em Meso Scale Discovery (MSD). Os domínios VHH anti-C5 foram expressos e purificados como na seção anterior e foram analisados quanto à sua capacidade de bloquear a clivagem da proteína C5 humana pela medida da quantidade de hC5a liberada. A concentração ótima para o domínio VHH da amostra foi determinada em experimentos-piloto. Os domínios VHH da amostra e os anticorpos de controle (h5G1.1, BNJ441 e Ec-CHO) foram adicionados à proteína C5 humana (concentração final 25 nM) (CompTech Inc.) em tampão GVB++ contendo gelatina 1% e NiCl 2,5 mM por 30 minutos a 37°C e armazenado a 4°C até uso posterior. Uma placa de 96 poços de alta ligação MSD foi revestida com um anticorpo anti-C5a 2 µg/mL em solução salina tamponada com fosfato BupH (ThermoFisher) e incubada por 1 hora. Zymosan foi então adicionado a NHS em igual proporção para ativar a

via alternativa do complemento. Esta mistura de zymosan-NHS foi então adicionada à solução pré-incubada de VHH-hC5 e incubada a 37°C. A reação foi parada em diferentes pontos de tempo (0, 30, 60 e 90 minutos) por adição de futhan-EDTA. A placa foi centrifugada a 3600 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para uma nova placa de polipropileno. O bloqueador A foi adicionado por 1 hora em temperatura ambiente para bloquear a ligação não específica à placa MSD revestida. A placa MSD foi lavada e o sobrenadante das amostras acima foi adicionado. Esta placa foi incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos. A mistura de detecção de anticorpo biotina-Ab2942 (Abcam) 1 µg/mL e estreptavidina conjugada com sulfo-tag 0,5 µg/mL foi preparada e depois adicionada a cada poço e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Foi adicionado 2x tampão de leitura MSD a cada poço e o sinal eletro-quimioluminescente foi medido. Os dados brutos foram analisados usando o programa MSD de bancada. Os resultados deste experimento são mostrados na FIG. 2)

[00131] LCP0115, LCP0146, LCP0295, LCP0296, LCP0297 e LCP0302 inibiram a liberação de C5a e foram utilizados para posterior caracterização.

Exemplo 5. Análise de afinidade de domínios VHH anti-C5 por Biacore

[00132] Os domínios VHH anti-C5 foram priorizados com base na reatividade cruzada com C5 de cyno e oito domínios VHH anti-C5 purificados foram submetidos à análise de afinidade por Biacore. Os parâmetros cinéticos para ligação a C5 humano e de cyno para os oito candidatos iniciais são mostrados na Tabela 2. Dos oito candidatos analisados por afinidade, cinco domínios anti-C5 (LCP0115, LCP0143, LCP0146, LCP0296 e LCP0302) foram escolhidos e priorizados para humanização e análise adicional com base na afinidade combinada a C5 humano e de cyno.

Tabela 2. resultados da caracterização por Biacore de domínios VHH.

Amostra	C5	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
LCP0095	hC5	2,86e5	7,14e-4	2,50e-9	6,94
	cC5	4,56e5	1,68e-3	3,69e-9	12,9
LCP0115	hC5	1,13e5	3,48e-5	3,09e-10	0,08
	cC5	9,53e4	1,02e-5	1,07e-10	0,10
LCP0123	hC5	1,08e5	2,16e-4	1,99e-9	0,13
	cC5	1e5	3,81e-4	3,8e-9	0,14
LCP0136	hC5	4,86e5	8,82e-4	1,81e-9	2,47
	cC5	7,89e5	2,51e-4	3,18e-10	1,01
LCP0143	hC5	6,91e5	5,66e-5	8,2e-11	0,90
	cC5	7,41e5	1,24e-4	1,67e-10	0,81
LCP0146	hC5	2,24e6	9,75e-5	4,35e-11	0,42
	cC5	2,64e6	2,44e-4	9,22e-11	0,47
LCP0296	hC5	9,34e4	3,9e-5	4,17e-10	0,06
	cC5	6,84e4	1,06e-4	1,55e-9	0,03
LCP0302	hC5	1,14e5	2,22e-5	1,95e-10	0,03
	cC5	1,03e5	2,38e-5	2,32e-10	0,03

Exemplo 6. Humanização de domínios VHH anti-C5

[00133] Cinco domínios VHH anti-C5 priorizados (LCP0115, LCP0143, LCP0146, LCP0296 e LCP0302) foram humanizados por enxerto de CDR em linhagens germinativas humanas com similaridade de sequência a sequência de lhama. As CDRs foram baseadas na maior cobertura de aminoácidos entre as definições de IMGT e Kabat. Foram feitas mutações retrógradadas aos resíduos característicos de FR2 de lhama para manter a estabilidade do domínio VHH. As variantes humanizadas foram expressas em células Expi293 e testadas quanto à ligação ao C5 humano usando interferometria de camada biológica.

[00134] Outras mutações nas costas dos resíduos de lhama dos pais foram introduzidas em estruturas selecionadas para várias das variantes para melhorar sua afinidade pelo C5 humano. As construções foram expressas em células HEK293F e avaliadas quanto à ligação por interferometria de camada biológica.

[00135] Mutações retrógradadas adicionais em resíduos parentais de lhama foram introduzidas em estruturas selecionadas das variantes para otimizar ainda mais sua afinidade por C5 humano e as terminações N foram humanizados para EVQLV (SEQ ID NO: 147; quando

necessário) e as terminações C foram humanizadas para WGQG-TLVTVSS (SEQ ID NO: 148; onde necessário). Os candidatos resultantes de VHH anti-C5 priorizados são mostrados na Tabela 3 abaixo. As CDRs desses candidatos são mostradas na Tabela 4.

Tabela 3. Candidatos a domínio VHH anti-C5 humanizados

nome de VHH anti-C5 candidato	Sequência candidata	SEQ ID NO:
LCP0177	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGQGLEAVATITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRYGNSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	226
LCP0178	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEMGATINVMWFR-QAPGQGLEAVARLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGLTVTVSS	227
LCP0179	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQGLEAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	228
LCP0180	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGQGREFVATITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRYGNSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	229
LCP0181	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPMGATINVMWYR-QAPGQRELVARLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGLTVTVSS	230
LCP0182	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	231
LCP0183	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKREFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRYGNSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	232
LCP0184	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRYGNSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	233
LCP0185	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASEMGATINVMWYR-QAPGKQRELVSRLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGLTVTVSS	234
LCP0186	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASEMGATINVMWYR-QAPGKLELVSRLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVLLSRQINGAYVHWGQGLTVTVSS	235
LCP0187	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGKREFVSGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	236
LCP0188	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGKLEFVSGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	237
LCP0195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	1
LCP0197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	2
LCP0199	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	3
LCP0203	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQGLEFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	4

LCP0207	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSVKGRFTISRDNADSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	5
LCP0208	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSVKGRFTISRDNAD- NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	6
LCP0209	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSVKGRFTISRDNAD- NSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	7
LCP0212	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR- QAPGQGLEFVATITSGGSAIYTDVSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSS	8
CRL0303	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFSDYAMAWFR- QAPGQEREFVAGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	9
CRL0304	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFR- QAPGQEREFVAGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	10
CRL0305	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFR- QAPGQEREFVAGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTNSRD- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	11
CRL0307	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHHSYAMAWFR- QAPGQEREFVAGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	12
CRL0726	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFR- QAPGQGLEAVASISWGGMWTYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSY- GYWGQGLTVTVSS	238
CRL0727	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFR- QAPGQGLEAVATITSGGSTLSADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVP- TENEYGHWGQGLTVTVSS	239
CRL0728	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFR- QAPGQEREFVASISWGGMWTYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSY- GYWGQGLTVTVSS	240
CRL0729	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFR- QAPGQEREFVATITSGGSTLSADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVP- TENEYGHWGQGLTVTVSS	241
CRL0730	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFR- QAPGKEREVSSISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNAKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGLTVTVSS	242
CRL0731	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVGTISDYGMGWFR- QAPGKGLEFVSSISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNAKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGLTVTVSS	243
CRL0732	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFR- QAPGKEREVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVP- TENEYGHWGQGLTVTVSS	244
CRL0733	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVP- TENEYGHWGQGLTVTVSS	245
CRL0960	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRAFSYAMAWVR- QAPGQGLEWMGGIGWSSGGDTLYADSVRGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	246
CRL0961	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGRAFSYAMAWFR- QAPGQEREFMGGIGWSSGGDTLYADSVRGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	247

CRL0962	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGRAFSYAMAWFR- QAPGQGLEFMGGIGWSSGGDTLYADSVRGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	248
CRL0963	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASVGTISDYGMGWVR- QAPGQGLEWMGSISWGGMWTYADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGRGRMYR- GIGNSLAQPKSYGYWGQGLTVTVSS	249
CRL0964	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASVGTISDYGMGWFR- QAPGQREFMGSISWGGMWTYADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGRGRMYR- GIGNSLAQPKSYGYWGQGLTVTVSS	250
CRL0965	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASVGTISDYGMGWFR- QAPGQGLEFMGSISWGGMWTYADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARGRGRMYR- GIGNSLAQPKSYGYWGQGLTVTVSS	251
CRL0966	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGRTFSGILSAYAVGWVR- QAPGQGLEWMGTITSGGSTLSADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARA- VRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGLTVTVSS	252
CRL0967	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGRTFSGILSAYAVGWFR- QAPGQREFMGTITSGGSTLSADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARA- VRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGLTVTVSS	253
CRL0968	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGRTFSGILSAYAVGWFR- QAPGQGLEFMGTITSGGSTLSADSVKGY- TENFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDYAVYYCARA- VRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGLTVTVSS	254
CRL0972	EVQLVESGGGVVPRGGSLRLSFAASGRAFSYAMAWFR- QAPGKEREVSVGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	255
CRL0973	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSFAASGRAFSYAMAWFR- QAPGKEREVSVGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	256
CRL0974	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSFAASGRAFSYAMAWFR- QAPGKEREVSVGIGWSSGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	257
CRL0975	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASVGTISDYGMGWFR- QAPGKEREVSSISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	258
CRL0976	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASVGTISDYGMGWFR- QAPGKEREVSSISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	259
CRL0977	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSFAASVGTISDYGMGWFR- QAPGKEREVVASISWGGMWTYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	260
CRL0978	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGWFR- QAPGKEREVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	261
CRL0979	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGWFR- QAPGKEREVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	262
CRL0980	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSFAASGRTFSGILSAYAVGWFR- QAPGKEREVSTITSGGSTLSADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTALYHCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGLTVTVSS	263

Tabela 4: CDRs de domínios VHH anti-C5 humanizados candidatos

Domínio VHH	Sequência de CDR1 [SEQ ID NO:]	Sequência de CDR2 [SEQ ID NO:]	Sequência de CDR3 [SEQ ID NO:]
LCP0146 LCP0179 LCP0182 LCP0187 LCP0188 LCP0195 LCP0197 LCP0199 LCP0203 CRL0960 CRL0961 CRL0962 CRL0972 CRL0973 CRL0974	GRAFSDYAMA [13]	GIGWSSGGDTLYADSVRG [18]	AARQQQYIYSSMRSDSYDY [20]
LCP0115 LCP0177 LCP0180 LCP0183 LCP0184 LCP0207 LCP0208 LCP0209 LCP0212	GRTFSGILSPYAVG [14]	TITSGGSAIYTDVSKG [19]	AVRTRRYGNSNLGEVPQENEYGY [21]
LCP0143 LCP0178 LCP0181 LCP0185 LCP0186	EMGATINVMA [327]	RLPLDNNIDYGDFAKG [325]	NVLLSRQINGAYVH [326]
CRL0303	GRHFSDYAMA [15]	GIGWSSGGDTLYADSVRG [18]	AARQQQYIYSSMRSDSYDY [20]
CRL0304 CRL0305	GRAHSDYAMA [16]	GIGWSSGGDTLYADSVRG [18]	AARQQQYIYSSMRSDSYDY [20]
CRL0307	GRHHSYAMA [17]	GIGWSSGGDTLYADSVRG [18]	AARQQQYIYSSMRSDSYDY [20]
LCP0296 CRL0726 CRL0728 CRL0730 CRL0731 CRL0963 CRL0964 CRL0965 CRL0975 CRL0976 CRL0977	VGTISDYGMG [264]	SISWGGMWTDYADSVKG [266]	GRGRMYRGIGNSLAQPKSYGY [268]
LCP0302 CRL0727 CRL0729 CRL0732 CRL0733 CRL0966 CRL0967 CRL0968 CRL0978 CRL0979 CRL0980	GRTFSGILSAYAVG [265]	TITSGGSTLSADSVKG [267]	AVRTWPYGSNRGEVPTENEYGH [269]

[00136] Mutações retrógradas para resíduos parentais de lhama foram introduzidas em estruturas selecionadas a partir de avaliações de humanização para melhorar a afinidade das variantes selecionadas. As sequências das variantes com mutação retrógrada são mos-

tradas na Tabela 5. As construções foram expressas em células HEK293F e avaliadas quanto à ligação por interferometria de camada biológica.

Tabela 5. Variantes de VHH anti-C5 humanizadas com mutações retrógradadas

Nome da variante	Sequência da variante com mutação retrógrada	SEQ ID NO
Variantes de LCP0115		
LCP0204	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	270
LCP0205	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGRFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	232
LCP0206	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	271
LCP0207	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	5
LCP0208	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	6
LCP0209	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	7
LCP0210	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	272
LCP0211	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	273
LCP0212	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR-QAPGQGLEFVATITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSLNLEVPQENEYGYWGQGLTIVTSS	8
Variantes de LCP0146		
LCP0193	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	274
LCP0194	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGKREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	275
LCP0195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	1
LCP0196	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	276
LCP0197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	2
LCP0198	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYDAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTIVTSS	277

LCP0199	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTL M YLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTLVTVSS	3
LCP0200	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTL S LQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTLVTVSS	278
LCP0201	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTL L YLQMNSL K AEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTLVTVSS	279
LCP0202	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTL L YLQMNSL R PEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTLVTVSS	280
LCP0203	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGQ L EFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTL L YLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTLVTVSS	4

Exemplo 7. Isolamento de domínios VHH que se ligam a albumina sérica humana

[00137] A albumina é uma proteína abundante no soro e possui peso molecular suficiente para evitar a remoção por filtração através da barreira de filtração glomerular. A remoção da albumina do soro por degradação intracelular é inibida pela interação de FcRn com a albumina que ocorre em pH baixo. Essa interação resulta no tráfego do complexo albumina-FcRn de volta à membrana plasmática, onde a albumina é liberada de volta ao sangue após a exposição ao pH mais neutro do sangue.

[00138] Visão geral do processo de geração de VHH anti-HSA.

Uma biblioteca de apresentação em fagos de VHH anti-HSA imune foi produzida a partir de células B de uma lhama imunizada para domínios VHH anti-C5 e para domínios VHH anti-HSA. Após a obtenção dos títulos de ponto final maiores que 1,000,000 em relação à HSA, as PBMCs foram coletadas, RNA isolado e as regiões de VHH isoladas geneticamente. Como descrito em detalhes para domínios VHH anti-C5 nos Exemplos 2-4, essas sequências VHH anti-HSA foram clonadas em um fagomídeo de fusão pIII, resultando em uma biblioteca de 6×10^8 clones independentes. Técnicas padronizadas de panning por apresentação em fago foram usadas para selecionar domínios VHH

reativos para HSA e CSA (albumina sérica de macaco *Cynomolgus*). Os resultados de três rodadas de panning foram analisados por ELISA e sequenciamento Sanger. Paralelamente, o sequenciamento de próxima geração (NGS) foi usado para examinar populações de sequências na biblioteca original ou sequências que foram enriquecidas por panning. Um total de ~1000 clones foram isolados e analisados utilizando estes métodos.

[00139] *Imunização de lhama e construção de biblioteca de fago de VHH*. Uma lhama foi imunizada com HSA. O estímulo primário consistiu em 500 µg de antígeno misturado com adjuvante completo de Freund. As imunizações de reforço de 500 µg de antígeno em adjuvante incompleto de Freund foram administradas em 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas e 12 semanas. Os títulos de soros foram monitorados com sangramentos de teste aproximadamente 2 semanas após cada reforço. Os sangramentos de teste foram analisados por ELISA para determinar o título da resposta imune. Um título de soro anti-HSA foi detectado com sinal 20x acima do pré-sangramento para a diluição de 1:100,000; portanto, um sangramento de produção de 500 mL foi processado para obter ~ 7×10^8 PBMCs para isolamento de RNA e produção de biblioteca. O RNA total das PBMCs foi purificado com extração com fenol/clorofórmio, seguido de uma coluna de centrifugação de sílica e o RNA total foi eluído com água livre de RNase. A qualidade do RNA foi avaliada através da determinação da proporção $OD_{260}/_{280}$ e por eletroforese em gel de agarose. O cDNA foi sintetizado usando iniciadores reversos específicos da cadeia pesada de lhama. Os fragmentos de VHH (somente cadeia pesada) foram separados dos fragmentos de VH (cadeia pesada convencional) por eletroforese em gel.

[00140] Os fragmentos de VHH foram modificados com lítios *SfiI* e clonados em pADL-10b, e a biblioteca de DNA foi transformada em células TG1. Um total de 6×10^8 clones independentes foram obtidos

para a biblioteca. Todos os clones foram coletados e armazenados em glicerol a 25% a -80°C até o uso. A qualidade da biblioteca foi validada pela análise de 105 clones quanto à presença de um inserto com uma fase de leitura correta, singularidade e presença de sequências de iniciadores.

[00141] *Panning e rastreamento por apresentação em fago.* Uma alíquota do estoque em glicerol da biblioteca de VHH anti-HSA compreendendo $3,75 \times 10^{10}$ células foi cultivada em meio 2xYT suplementado com glicose 2% e carbenicilina 100 µg mL. As células foram cultivadas a 37°C com agitação a ~250 rpm até que OD₆₀₀ de ~0,6 fosse obtida. O fago auxiliar foi adicionado a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20 e a cultura foi incubada por 30 minutos sem agitação, seguida de incubação por 30 minutos com agitação a 37°C. As células foram colhidas e ressuspensas em meio 2xYT suplementado com carbenicilina 25 µg/mL, canamicina 50 µg/mL e IPTG 200 µM. As culturas foram agitadas durante a noite a 30°C e 250 rpm. O meio foi clarificado por centrifugação, os fagos foram precipitados pela adição de 1/4 de volume de PEG-8000 10%/NaCl 2,5 M e incubação em gelo por 30 minutos. Os fagos foram peletizados por centrifugação a 7500 rpm durante 15 minutos a 4°C em um rotor SLA3000. O pélete foi ressuspenso em Superblock (Thermo Scientific, 37515).

[00142] Uma alíquota de fago foi desmarcada com esferas de estreptavidina M280 (Life Technologies, 11205D) por 30 minutos em temperatura ambiente, as esferas foram removidas usando um ímã e o sobrenadante contendo o fago foi transferido para um novo tubo Eppendorf. Os fagos foram suplementados com 10 µg de HSA biotinizada, incubados com rotação em temperatura ambiente por 30 minutos e depois suplementados com esferas de estreptavidina M280 para imobilizar a HSA biotinizada. As esferas foram lavadas 11 vezes com tampão de lavagem PBS/Tween 0,05%, eluídas com glicina 0,1 M, pH 2,7,

e depois o tampão de eluição foi neutralizado com Tris 1 M, pH 9,0. Os fagos eluídos foram resgatados em células TG1 de fago logarítmicas e os produtos foram recuperados em bandejas de 250 cm x 250 cm com LB Carbenicilina, glicose 2%. Os títulos foram determinados por diluição seriada de uma alíquota do resgate do fago. Uma segunda rodada de panning foi realizada essencialmente como descrito acima, usando uma alíquota do crescimento da primeira rodada e 5 µg de HSA biotinilada para as seleções.

[00143] Para rastrear clones quanto à reatividade a HSA, clones individuais foram colocados em placas de 96 poços, cultivados em um volume de 250 µL de 2xYT suplementado com 100 µg/mL de Carbenicilina e 2% de glicose durante a noite a 37°C. Cada poço foi subcultivado por transferência de 5 µL culturas densas noturnas para 250 µL de meios frescos. Uma alíquota foi submetida para análise da sequência de amplificação por círculo rolante para determinar o inserto codificado. As células foram cultivadas até um OD₆₀₀ de -0,6 e depois suplementadas com fago auxiliar M13 em MOI de 20 por uma hora. As células foram coletadas por centrifugação e o meio foi substituído por 250 µL por poço de 2xYT suplementado com 100 µg/mL de carbenicilina e 50 µg mL de canamicina. As placas foram então incubadas durante a noite a 30°C com agitação a 250 rpm. O meio foi clarificado por centrifugação para preparar os sobrenadantes dos fagos para uso em ensaios ELISA.

[00144] Para análise ELISA, placas de 96 poços pré-bloqueadas revestidas com estreptavidina (Pierce, 15500) foram incubadas com has-Biotina a 2 µg/mL por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação. As placas foram lavadas e depois o bloqueio foi repetido por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e suplementadas com 50 µL de sobrenadante clarificado por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes e

depois incubadas com anticorpo anti-M13 HRP (GE Healthcare, Cat # 27-9421-01) em tampão de bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes, depois suplementadas com o reagente Ultra TMB -ELISA de 1 etapa (Thermo Scientific, Cat # 34029), a cor foi desenvolvida e a reação foi interrompida usando soluções de parada de ácido sulfúrico 2 M. As leituras em OD₄₅₀ foram determinadas usando um leitor de placas BioRad iMark.

[00145] NGS foi usado para examinar populações de sequências na biblioteca original ou sequências que foram enriquecidas por panning. Para NGS, o DNA do fagomídeo foi isolado a partir de produtos da biblioteca inicial, da rodada 1 de panning e da rodada 2 de panning. O cassete de VHH foi liberado do fagomídeo por digestão de restrição, bandas codificadoras de VHH isoladas por eletroforese em gel de agarose e o DNA purificado utilizando colunas de afinidade de DNA. Esse DNA foi submetido à produção e análise da biblioteca na plataforma MiSeq 2x300.

Exemplo 8. Expressão e purificação de domínios VHH que se ligam a HSA

[00146] As sequências de VHH selecionadas usando as metodologias acima foram sintetizadas com peptídeos de sinal N-terminais e 6x His-tags C-terminais e clonadas em um construto de expressão em mamífero. O domínio MSA21 de VHH publicado (Publicação Internacional No. WO 2004/062551 A2) e versões geneticamente modificadas de clones individuais (desglicosilados ou humanizados) foram preparadas por síntese de GeneBlocks (Integrated DNA Technologies) e clonagem por infusão em um vetor de expressão padronizado em mamíferos. Estes construtos foram transfectados para células 293expi e o sobrenadante foi coletado 96 horas após a transfecção. Os sobrenadantes foram dialisados contra PBS e as proteínas VHH-His purificadas usando métodos padronizados de cromatografia. As proteínas

purificadas foram trocadas de tampão em PBS e quantificadas usando OD e coeficiente de extinção.

Exemplo 9. Caracterização de domínios VHH imobilizados que se ligam a HSA solúvel, CSA e albumina sérica de camundongo

[00147] Os vetores de expressão de mamíferos foram criados para 112 sequências de VHH e proteínas produzidas no sistema de expressão 293 expi. As sequências de VHH foram analisadas primeiro por SDS-PAGE e coloração com Coomassie para determinar a concentração aproximada em relação a um padrão conhecido. As concentrações do sobrenadante foram então normalizadas e submetidas a interferometria de camada biológica em um Octet HTX (Pall/ForteBio). Os sensores Penta-His foram expostos ao tampão cinético por 60 segundos para estabelecer as medições da linha de base. Os sensores foram então carregados com sobrenadantes contendo VHH-His por 300 segundos antes de uma segunda linha de base ser estabelecida em tampão cinético por 120 segundos. As pontas foram então incubadas com HSA ou CSA 100 nM em tampão cinético por 600 segundos e a dissociação foi medida por mais 600 segundos.

[00148] Dos 112 domínios de VHH analisados, 12 domínios demonstraram ligação a HSA biotinilada e três clones (HAS040, HAS041 e HAS042) interagiram com CSA biotinilada e o HSA biotinilada. As sequências desses 12 domínios de VHH anti-HSA, incluindo uma ou mais versões humanizadas, são mostradas na Tabela 6, com as CDRs desses domínios de VHH anti-HSA mostrados na Tabela 7.

Tabela 6. Sequências de domínios de VHH antialbumina

Domínio de VHH	Sequência	SEQ ID NO:
HAS020	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGSDAAGWFR-QASGKEREVVASISWSGGYTYADSVKGRFTISSD-NVKNTVYLMNSLTPEDTAVYFCATGNRYSYRISLVTSPQYEWGQGLVTVS	22
HAS038	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGHFSFSTYTVGWFR-QAPGEERKFVASISWSGEVTLYGDSVKGRFTISRDNRK-KTVYLMHSLKPEDSAIYYCAAKRGGRPDSSD-DYFYWGQGTQVTVSS	23
HAS040	QVQLNESGGGMVQAGGSLRLSCAASGRTVSNYAAGWFR-QAPGKEREVVAAINWNKTTTTYADSVKGRFISREYAK-NTVALQMNSLKPEDTAVYYCAAVFRIVAP-KTQYDYWGQGTQVTVSS	24

HAS041	QVQLIESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR-QAPGKEREVVAIINWNTATYADSVKGRFTISRDNAKSTVALQMNSLKPEDTAVYYCAAVFRVAVP-KTQYDYDYWGQGTQVTVSS	25
HAS042	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR-QAPGKEREVVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAVP-KTQYDYDYWGQGTQVTVSS	26
HAS044	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAIGWFR-QAPGKAREFVARVSTIAGDTDYADSVKGRFTISRDNK-NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCA-ADSYNVRLVTGEADYWGEGTQVTVSS	27
HAS077	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAIGWFR-QAPGKAREFVARVSTIAGDTDYADSVKGRFTISRDNK-NTVYLQMNSLKPEDTAVYYCA-ADSYNVRLGTGEADYWGEGTQVTVSS	28
HAS079	EVQLVESGGGLVQAGDLSRLSCAASGFTFSNYAIGWFR-QAPGKAREFVARVSTIAGDTDYANAVKGRFTISRDNK-NTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAAESYNVRLVTGEADYWGEGTQVTVSS	29
HAS080	QVRLAESGGGRVQAGESLRLSCVASGRTFSN-DAAGWFREASGKEREVVASISWSGNYTYADSVKGRFTISED-NVKNTVYLMQMTSLKPEDTAVYYCAAGNRYSDYRISLVTPLRYEY-WGQGTQVTVS	30
HAS081	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSDAAGWFR-QASGKEREVVAISWSGNYTYSADSVKGRFTISSD-NVKNTVYLMQNSLKPEDTAVYLCAGNRYSDYRISLVTSPQYEY-WGQGTQVTVS	31
HAS091	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGSDAAGWFR-QASGKEREVVASISWSGGYTYADSGTGRFTISSD-NVKNTVYLMQNSLTPEDTAVYFCATGNRDSYRISLVTSPQYEY-WGQGTQVTVS	32
HAS093	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGSDAAGWFR-QASGKEREVVASISWSGGYTYADSGKGRFTISSD-NVKNTVYLMQNSLTPEDTAVYFCATGNRYSDYRISLVTSPQYDYWGQGTQVTVS	33
HAS096	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFGSDAAGWFR-QASGKEREVVASISWSGGYTYADSVKGRFTSSD-NVKNTVYLMQNSLTPEDTAVYFCATVNRYSYRISLVTSPQYEY-WGQGTQVTVS	34

Tabela 7. Sequências de CDR para os domínios de VHH antialbumina

Domínio de VHH	Sequência de CDR1 [SEQ ID NO:]	Sequência de CDR2 [SEQ ID NO:]	Sequência de CDR3 [SEQ ID NO:]
HAS020	GRTFGSDA [35]	ISWSGGYT [44]	ATGNRYSDYRISLVTSPQYEY [52]
HAS038	GHSFSTYT [36]	ISWSGEVT [45]	AAKRGGRPTDSSDDYFY [53]
HAS040	GRTVSNYA [37]	INWNKTTT [46]	AAVFRIVAPKTQYDYDY [54]
HAS041	GRPVSNYA [38]	INWNKTAT [47]	AAVFRVAVP-KTQYDYDY [55]
HAS042	GRPVSNYA [38]	INWQKTAT [48]	AAVFRVAVP-KTQYDYDY [55]
HAS044	GRTFSSYA [39]	VSTIAGDT [49]	AADSYNVRLVTGEADY [56]
HAS077	GRTFSSYA [39]	VSTIAGDT [49]	AADSYNVRLGTGEADY [57]
HAS079	GFTFSNYA [40]	VSTIAGDT [49]	AAESYNVRLVTGEADY [58]
HAS080	GRTFSNDA [41]	ISWSGNYT [50]	AAGNRYSDYRISLVTPLRYEY [59]
HAS081	GRTFSSDA [42]	ISWSGNYT [50]	AAGNRYSDYRISLVTSPQYEY [60]
HAS091	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATGNRDSYRISLVTSPQYEY [61]
HAS093	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATGNRYSDYRISLVTSPQYDY [62]
HAS096	GRTFGSDA [43]	ISWSGGYT [51]	ATVNRYSYRISLVTSPQYEY [63]

Exemplo 10. Caracterização da cinética de ligação da albumina por Biacore

[00149] A cinética de ligação dos domínios HAS040 e HAS041 de VHH a HSA ou CSA foi determinada usando SPR em um instrumento Biacore 3000. A albumina biotinizada foi capturada em um chip CAP

saturado com reagente Biotin CAPture contendo desoxirribo-oligonucleotídeos (obtidos da GE Healthcare). As concentrações de domínios VHH purificados foram injetadas por 5 minutos em uma taxa de fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Três concentrações foram avaliadas por domínio de VHH. O analito ligado foi deixado dissociar por 600 segundos. A superfície do chip foi regenerada após cada concentração pela injeção de guanidina 6M HCl/NaOH 0,25 M por 2 minutos a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A cinética foi determinada em pH 7,4 e pH 6,0 no tampão HBS-EP usando um modelo de Langmuir 1:1 (R_{max} local e RI constante) e subtração da referência dupla (subtração de um ciclo de concentração de tampão do ciclo de concentração da amostra e subtração de um fluxo celular paralelo de referência). O domínio MSA21 de VHH (Publicação Internacional No. WO 2004/062551 A2) (sequência:

LEQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPG
 KGVEWVSGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKP
 EDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTSS (SEQ ID NO:322) foi preparado e usado como comparação nesses ensaios.

[00150] Os resultados deste ensaio são mostrados na Tabela 8. Afinidades de ligação foram observadas na faixa de 0,3-5 nM, indicando que os domínios HAS040 e HAS041 têm afinidade suficiente em pH 6 e pH 7,4 para facilitar a extensão da meia-vida. Além disso, esses domínios de VHH demonstraram a ligação a CSA e HSA com afinidades muito semelhantes, reforçando a natureza preditiva dos estudos de extensão da meia-vida a serem realizados em primatas.

Tabela 8. Resultados da caracterização por Biacore de domínios VHH antialbumina

Amostra	Albumina/pH	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
HAS40	CSA/pH 6,0	3,68E+05	2,81E-04	7,64E-10	0,05
	CSA/pH 7,4	1,04E+06	5,62E-04	5,39E-10	0,1
	HSA/pH 6,0	4,45E+05	2,08E-04	4,66E-10	0,09
	HSA/pH 7,4	1,29E+06	4,40E-04	3,41E-10	0,03
HAS41	CSA/pH 6,0	3,12E+05	7,39E-04	2,37E-09	0,41
	CSA/pH 7,4	1,07E+06	1,23E-03	1,15E-09	0,18
	HSA/pH 6,0	3,73E+05	3,87E-04	1,04E-09	0,12
	HSA/pH 7,4	1,23E+06	5,66E-04	4,61E-10	0,03

MSA21	CSA/pH 6,0	2,80E+05	1,53E-03	5,47E-09	0,05
	CSA/pH 7,4	5,61E+05	2,16E-03	3,85E-09	0,05
	HSA/pH 6,0	3,30E+05	1,81E-03	5,46E-09	0,06
	HSA/pH 7,4	1,13E+06	3,93E-03	3,49E-09	0,07

Exemplo 11. Demonstração da ligação não competitiva da albumina por VHH e FcRn

[00151] A reciclagem de albumina de vesículas endocíticas é medida pela interação com FcRn. Portanto, foi importante determinar se VHH interferiria na interação de HSA e FcRn. Para determinar se os domínios HAS040 e HAS041 de VHH se ligam ao mesmo epítipo que FcRn, a ligação de FcRn a HSA que foi saturada com domínios de VHH anti-HSA foi analisada em um instrumento Biacore 3000 em pH 6,0 em tampão HBS-EP. HSA foi imobilizada diretamente em um chip CM5 para atingir uma densidade alvo de 250 RUs (unidades de ressonância) usando acoplamento de amina. Os domínios VHH foram diluídos para aproximadamente 1-10 µg/mL e injetados para atingir a saturação (3 minutos a 50 µL/min). Uma concentração de FcRn foi injetada sobre a superfície HSA:VHH para obter cinética por 5 minutos a 50 µL/min. A dissociação foi permitida por 180 segundos antes da regeneração. A superfície do chip foi regenerada injetando 20 µL de NaOH 25 mM a 100 µL/min. A cinética foi determinada usando um modelo Langmuir 1:1 (R_{max} local e RI constante) e subtração da referência dupla (subtração de um ciclo de concentração de tampão do ciclo de concentração da amostra e subtração de um fluxo celular paralelo de referência).

[00152] Os resultados são mostrados na FIG. 7. Na FIG. 7A, a interação direta de FcRn com uma superfície saturada de HSA resultou em uma diferença de resposta de 30 RUs. RUs similares foram obtidas quando FcRn 400 nM foi injetado sobre superfície saturada com complexos de HSA com MSA21 (ADL021) (FIG. 7B), HAS040 (FIG. 7C) ou HAS041 (FIG. 7D). Com base nesses dados, o HAS040 e o HAS041 não interferem na ligação a FcRn e é esperado que sejam reciclados a

partir do endossoma pela interação da albumina com o FcRn.

Exemplo 12. Geração de proteínas de fusão bi-específicas anti-C5 e antialbumina

[00153] Os domínios de VHH anti-C5 foram fundidos com um domínio antialbumina para gerar moléculas biespecíficas. Quatro comprimentos diferentes de ligantes $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 106), $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 107), $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO: 108) and $(G_4S)_6$ (SEQ ID NO: 109), e duas orientações diferentes (N terminal ou C terminal) do domínio antialbumina foram avaliados. Os construtos foram expressos em células HEK293F e purificados usando cromatografia de afinidade com proteína A. As moléculas de fusão purificadas foram avaliadas em experimentos por Biacore. C5 humano foi biotinilado e imobilizado em um chip biacore, moléculas biespecíficas purificadas foram injetadas para saturar o chip, seguido por três concentrações diferentes de albumina sérica humana para obter a cinética. A afinidade medida para a albumina sérica humana foi usada como representante para comparar com diferentes extensões de ligante. $(G_4S)_3$ foi escolhido como o ligante com extensão ótima para diferentes domínios de VHH anti-C5. A orientação N terminal versus C terminal dos construtos está especificada abaixo pelo nome do construto na Tabela 9 com (C5/HSA) indicando que o domínio anti-C5 está localizado N terminal ao domínio anti-HSA. Igualmente, com HSA/C5) indica que o domínio anti-HSA está localizado N terminal ao domínio anti-C5.

[00154] Após a seleção do comprimento ideal do ligante, uma série de moléculas de fusão biespecíficas diferentes foi gerada com domínios de VHH anti-C5 humanizados fundidos com dois domínios antialbumina diferentes (mostrados na Tabela 8). Estes construtos foram expressos em células Expi293 e purificadas utilizando cromatografia de proteína A. As proteínas de fusão biespecíficas purificadas foram testadas em ensaios de hemólise e os resultados são mostrados nas

FIGS. 3A e 3B.

Tabela 9. Proteínas de fusão anti-C5/antialbumina

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
CRL0400 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSIS GSGSDTLVADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLR SSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRHFSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGGDTLYADSVRGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LTVVSS	64
CRL0401 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLRSSHSSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	65
CRL0402 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLRSSHSSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	66
CRL0403 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLRSSHSSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	67
CRL0404 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLRSSHSSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	68
CRL0405 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLVADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLRSSHSSQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	69
CRL0406 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNTLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	70
CRL0407 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNTLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	71
CRL0408 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNTLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSGG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGT LTVVSS	72

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
CRL0409 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGG- GLVQPPGGSLRLSCAASGRHFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNLSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	73
CRL0410 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGG- GLVQPPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNLSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	74
CRL0411 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGG- GLVQPPGGSLRLSCAASGRHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNLSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	75
CRL0483 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNKDSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSD- TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSS	76
CRL0484 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNKDSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFSAIN- WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSS	77
CRL0485 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNK- NTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSD- TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSS	78
CRL0486 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNK- NTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFSAIN- WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSS	79
CRL0487 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNK- NSVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSD- TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSS	80
CRL0488 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNK- NSVYLQMNLSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFSAIN- WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSS	81
CRL0489 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGQGLEFVATITSGGSAIYTDSVKGRFTISRDNK- NSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSD- TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSS	82

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
CRL0490 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFR- QAPGGLEFVATITSGGSAIYDSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAIN- WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSS	83
CRL0491 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	84
CRL0492 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	85
CRL0493 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	86
CRL0494 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	87
CRL0495 (C5/HSA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	88
CRL0496 (C5/HSA)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	89
CRL0497 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQGLEFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	90
CRL0498 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQGLEFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	91

Nome	Sequência	SEQ ID NO:
CRL0499 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	92
CRL0500 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	93
CRL0501 (HSA/C5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQLEFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	94
CRL0502 (HSA/C5)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR- QAPGKREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVAP- KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG- GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQLEFVAGIGWSSG- DTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS- MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	95

[00155] Quatro moléculas biespecíficas CRL0483, CRL0484, CRL0499 e CRL0500 foram priorizadas com base em ensaios funcionais e de ligação. As medidas de afinidade por Biacore para ligação ao C5 humano para CRL0483, CRL0484, CRL0499 e CRL0500 são mostradas na Tabela 10 e avaliações funcionais são mostradas nas FIGS. 3, 4 e 5. Estas quatro moléculas biespecíficas foram avaliadas em estudos farmacocinéticos in vivo em macacos cynomolgus.

Tabela 10. Medidas por Biacore de fusões priorizadas em pH 7,4 e pH 6,0

Amostra	C5	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²
CRL0483	hC5	7,4	2,25e5	2,42e-4	1,07e-9	0,03
	cC5	7,4	9,15e4	2,20e-5	2,40e-10	0,01
CRL0484	hC5	7,4	7,01e4	7,69e-5	1,10e-9	0,04
	cC5	7,4	9,15e4	2,2e-5	2,40e-10	0,01
CRL0499	hC5*	7,4	2,22e6	3,32e-4	1,5e-10	3,3
	cC5	7,4	N,D,	N,D,	N,D,	N,D,
CRL0500	hC5	7,4	2,88e6	6,72e-4	2,33e-10	0,65

	cC5	7,4	2,00e6	8,48e-4	4,2e-10	0,04
CRL0483	hC5	6,0	4,00e4	2,11e-04	5,27e-09	0,02
	cC5	6,0	3,71e4	4,62e-5	1,25e-9	0,02
CRL0484	hC5	6,0	4,25e5	2,36e-4	5,56e-10	0,02
	cC5	6,0	4,82e4	6,17e-6	1,28e-10	0,03
CRL0499	hC5*	6,0	2,51e6	1,12e-3	4,48e-10	0,24
	cC5	6,0	1,92e6	3,88e-3	2,02e-9	0,31
CRL0500	hC5*	6,0	8,02e6	1,519e-3	1,89e-10	1,06
	cC5*	6,0	3,91e6	2,5e-3	6,41e-10	3,16

Exemplo 13. Análise farmacocinética de proteínas de fusão biespecíficas

[00156] As proteínas purificadas foram administradas a 10 mg/kg por via intravenosa ou subcutânea em macacos cynomolgus. Foram utilizados três macacos por grupo de dose por artigo de teste. As propriedades farmacocinéticas de moléculas biespecíficas foram medidas por quantificação baseada em LC-MS usando peptídeos de assinatura para cada construto. O perfil de PK é mostrado na FIG. 6 e os parâmetros estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos depois de 10 mg/kg de artigos de teste em macacos cynomolgus

Artigo de teste	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (µg/mL)	AUC (h*µg/mL)	C _L (mL/h/kg)	V (mL/kg)	F (%)
CRL0483 IV	139	1,33	324	47900	0,211	42,0	
CRL0484 IV	125	1	382	43700	0,238	43,0	
CRL0483 SC	103	20	238	46412	0,218	32,5	97
CRL0484 SC	75,9	24	161	32610	0,315	34,9	75
CRL0499 IV	170	2,11	299	53773	0,184	46,9	
CRL0500 IV	239	0,167	351	51929	0,205	62,5	
CRL0499 SC	220	32	146	58666	0,173	54,2	109
CRL0500 SC	209	32	161	61475	0,163	49,0	118

[00157] Também foram geradas sequências ligantes variantes para as proteínas de fusão biespecíficas. As sequências que incluem essas sequências de ligação variantes são mostradas na Tabela 12.

Tabela 12: Sequências de anti-C5/antialbumina biespecíficas com diferentes ligantes

Nome	Sequência	SEQ ID NO
CRL0952	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAIN-WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVP-KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGAGGGGAGGGGSEVQLVESGG-GLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSG-DTLYADSVRGRFTNSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGLTVTVSS	96
CRL0953	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVS-TITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKDSLQYLMNSLRAEDTAVYYCAVRTR-RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLTVTVSSGGGGAGGG- GAGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR-QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTQYDYDYWGQGLTVTVSS	97
CRL0954	EVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWFRQAPGKEREFVA-SISWGGMWDYADSVKGRFTISRDNKNAVYL-RMNSLNAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGTQVTVSSGGG-GAGGGGAGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR-QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTQYDYDYWGQGLTVTVSS	98
CRL0955	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFRQAPGKEREFVS-TITSGGSLSADSVKGRFTLSRDNAKDTVYLMNSLK-PEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGTQVTVSSGGGGAGGG- GAGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFR-QAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTQYDYDYWGQGLTVTVSS	99
CRL0956	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAIN-WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVP-KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGAGGG- GAGGGGSEVQLVESGGGVVQAGDSLTLTCTAPVGTISDYGMGWFR-QAPGKEREFVASISWGGMWDYADSVKGRFTISRDNKNAVYL-RMNSLNAEDTAVYYCGRGRMYRGIGNSLAQPKSYGYWGQGTQVTVSS	100
CRL0957	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAIN-WQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVP-KTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGAGGGGAGGGGSEVQLVESGG-GLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSGILSAYAVGWFRQAPGKEREFVSTIT-SGGSTLSADSVKGRFTLSRDNAKDTVYLMNSLK-PEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGTQVTVSS	101

Exemplo 14. Sequências variantes de ligante peptídico

[00158] Os construtos foram gerados usando o domínio de ligação à albumina HAS042 (SEQ ID NO: 26) e VHH anti-C5 humanizado CRL0305 (SEQ ID NO: 11). Os construtos que foram avaliadas estão listados na Tabela 13.

Tabela 13. Ligantes usados para gerar as proteínas de fusão

Proteína	Ligante	SEQ ID NO	C5 Humano e albumina humana que se ligam ao octeto
TPP-3211	Nenhum domínio antialbumina (apenas anti-C5)		não
TPP-3212	Nenhum domínio anti-C5 (apenas antialbumina)		não
TPP-3213	Sem ligante		sim
TPP-3214	GGGGG	104	sim
TPP-3215	EAAAKEAAAKEAAA	110	sim
TPP-3216	PAPAP	111	sim
TPP-3217	GGGGSPAPAP	112	sim
TPP-3218	PAPAPGGGGG	113	sim
TPP-3219	GSTSGKSSEKKG	114	sim

TPP-3220	GGGDSGGGDS	115	sim
TPP-3221	GGGESGGGES	116	sim
TPP-3222	GGGSGGGGS	105	sim
TPP-3223	GGGDSGGGGS	117	sim
TPP-3224	GGGASGGGGS	118	sim
TPP-3225	GGGESGGGGS	119	sim
TPP-3226	ASTKGP	120	sim
TPP-3227	ASTKGPSVFPLAP	121	sim
TPP-3228	GGGGGGGP	123	sim
TPP-3229	GGGGGGGGP	321	sim
TPP-3230	PAPNLLGGP	124	sim
TPP-3231	PNLLGGP	323	sim
TPP-3232	GGGGGG	125	sim
TPP-3233	GGGGGGGGGGGG	126	sim
TPP-3234	APELPGGP	127	sim
TPP-3235	SEPQPQPG	128	sim
TPP-1252	GGGSGGGGSGGGGS	106	sim

[00159] Os 26 construtos listados na Tabela 13 foram expressos e as proteínas de fusão foram avaliadas quanto à ligação à C5 e albumina humana (Tabela 13 - ligação ao octeto), geração de agregados, hidrofobicidade (HIC HPLC) e glicosilação (espectrometria de massa por eletrospray). Para a análise do octeto, C5 humano biotinilado foi capturado em um chip CAP seguido de uma injeção de uma molécula bi-específica de teste. Várias concentrações de albumina foram posteriormente injetadas. A cinética foi determinada em pH 7,4 (Biacore 3000). Todas as moléculas bi-específicas se ligam a C5 e a albumina, cada uma com uma afinidade semelhante à albumina (5-6 nM).

[00160] As proteínas de fusão bi-específicas foram testadas quanto à sua capacidade de inibir a hemólise em um ensaio de hemólise *in vitro*. Os dados são mostrados nas FIGS. 9A e 9B.

[00161] A Tabela 14 mostra a cinética de ligação para a ligação de CRL0500 e CRL0952 ao C5 humano (hC5) e ao de cynomolgus C5 (cC5).

Tabela 14. Cinética de ligação biespecífica a C5

Amostra	Antígeno	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	χ^2
CRL0500	hC5	7,4	9,60e+06	4,91e-04	5,12e-11	0,24
CRL0500	cC5	7,4	3,74e+06	8,18e-04	2,19e-10	0,01
CRL0952	hC5	7,4	1,01e+07	5,39e-04	5,36e-11	0,27
CRL0952	cC5	7,4	3,53e+06	7,86e-04	2,23e-10	0,01
CRL0500	hC5	6,0	7,56e+06	1,04e-03	1,38e-10	0,54
CRL0500	cC5	6,0	5,51e+06	4,10e-03	7,44e-10	0,07
CRL0952	hC5	6,0	5,84e+06	9,07e-04	1,55e-10	0,58
CRL0952	cC5	6,0	5,55e+06	3,99e-03	7,20e-10	0,06

[00162] A Tabela 15 mostra a cinética de ligação para a ligação de CRL0500 e CRL0952 a Plasbumin® e albumina de cynomolgus.

Tabela 15. Cinética biespecífica para albumina

Amostra	Albumina	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	χ^2
CRL0500	Plasbumin	7,4	3,70e06	3,46e-03	9,36e-10	0,30
CRL0500	Plasbumin	6,0	3,55e06	2,0e-03	5,63e-10	0,17
CRL0952	Plasbumin	7,4	3,98e06	3,59e-03	9,01e-10	0,21
CRL0952	Plasbumin	6,0	3,23e06	2,10e-03	6,49e-10	0,10
CRL0500	cyno	7,4	3,32e06	1,26e-02	3,78e-09	0,42
CRL0500	cyno	6,0	3,27e06	6,93e-03	2,12e-09	0,43
CRL0952	cyno	7,4	2,93e06	1,52e-02	5,19e-09	0,17
CRL0952	cyno	6,0	3,03e06	7,55e-03	2,49e-09	0,22

Exemplo 15. Ligação dependente do pH de domínios VHH anti-C5

[00163] O rastreamento de histidina foi realizado em todas as CDRs para os domínios de VHH anti-C5 LCP0115, LCP0143, LCP0146 e LCP0302. Substituições únicas de histidina foram geradas em cada posição nas CDRs (mostradas em negrito, texto sublinhado). As variantes foram transfectadas na cultura de células Expi293 e avaliadas quanto à ligação dependente do pH em pH 7,4, 6,0 e 5,5. Várias variantes de cada anticorpo exibiram ligação dependente do pH. Essas variantes estão listadas na Tabela 16 e sua resposta de ligação dependente de pH é ilustrada nas FIGS. 11A-D.

Tabela 16. Variantes com histidina rastreada pré-humanizadas de domínios de VHH anti-C5

Nome da variante	Sequência de histidina variante	SEQ ID NO
Variantes de LCP0115 v		
CRL0085	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGRFVSTITSGGSAIYDSVKGRFTLSRDNAKDTVYLQMNSLK-PEDTAVYYCHVRRTRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGTQVTVSS	281
CRL0091	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGRFVSTITSGGSAIYDSVKGRFTLSRDNAKDTVYLQMNSLK-PEDTAVYYCAVRRRHGSNLGEVPQENEYGYWGQGTQVTVSS	282
Variantes de LCP0143		
CRL0120	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMAWYRQAPGKQRELVARLPHDNNIDYGDFAKGRFTISRDIRNTVYLQMNLLKPDdTAVYYCNVLLSRQIN-GAYVHWGQGTQVTVSS	283
CRL0121	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMAWYRQAPGKQRELVARLPLHNNIDYGDFAKGRFTISRDIRNTVYLQMNLLKPDdTAVYYCNVLLSRQIN-GAYVHWGQGTQVTVSS	284
CRL0133	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMAWYRQAPGKQRELVARLPLDNNIDYGDFAKGRFTISRDIRNTVYLQMNLLKPDdTAVYYCHVLLSRQIN-GAYVHWGQGTQVTVSS	285

CRL0135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMAWYRQAPGKQRELVARL-PLDNNIDYGDFAKGRFTISRDIRNTVYLQMNHLKPDPTAVYYCNVHLSRQIN-GAYVHWGQGTQVTVSS	286
CRL0144	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPEMGATINVMAWYRQAPGKQRELVARL-PLDNNIDYGDFAKGRFTISRDIRNTVYLQMNHLKPDPTAVYYCNVLLSRQIN-GAHVHWGQGTQVTVSS	287
Variantes de LCP0146		
CRL0149	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRHFSDYAMAWFR-QAPGKEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMSLQMNSLK-PEDTAVYYCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGTQVTVSS	288
CRL0150	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFR-QAPGKEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMSLQMNSLK-PEDTAVYYCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGTQVTVSS	289
CRL0166	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGKEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMSLQMNSLK-PEDTAVYYCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGTQVTVSS	290
CRL0180	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR-QAPGKEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTNSKDNAKNRMSLQMNSLK-PEDTAVYYCAARQQQHLYSSMRSDSYDYWGQGTQVTVSS	291
Variantes de LCP0302		
CRL0623	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSGILSHYAVGWFR-QAPGKEREVAVTITSGGSTLSADSVKGRFTLSRDNAKDTVYLQMNLSLK-PEDTAVYYCAVRTWPYGSNRGEVPTENEYGHWGQGTQVTVSS	292

[00164] Mutações únicas de histidina identificadas para ligação dependente de pH foram combinadas para aumentar a sensibilidade ao pH. As sequências dessas variantes são mostradas na Tabela 17. Estas variantes foram avaliadas em interferometria em camada biológica para ligação dependente de pH e os resultados são mostrados nas FIGS. 12A e 12B.

Tabela 17. Variantes da combinação de rastreamento de histidina dos domínios de VHH anti-C5 humanizados

Nome da variante	Sequência de histidina variante	SEQ ID NO
Combinação de variantes LCP0115		
CRL0282	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY-LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRHGSNLGEVQENEYGYWGQGTQVTVSS	293
Combinação de variantes LCP0146		
CRL0303	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRHFSDYAMAWFR-QAPGQEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTQVTVSS	9
CRL0304	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAHSDYAMAWFR-QAPGQEREVAVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGTQVTVSS	10

CRL0305	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRA AF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	294
CRL0306	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRA AF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD TL ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	295
CRL0307	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD TL ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	12
CRL0308	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	296
CRL0309	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRA AF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	297
CRL0310	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	298
CRL0311	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD TL ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	299
CRL0312	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	296
CRL0313	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD TL ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	300
CRL0314	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRA AF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	297
CRL0315	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ YI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	301
CRL0316	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD TL ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	302
CRL0317	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR AH SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	303
CRL0318	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR HF SDYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSGGD THY ADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGGQ HI YSS-MRSDSYDYWGQGTLLTVSS	304

Exemplo 16. Geração de fusões anti-C5 e antialbumina biespecíficas

[00165] Os domínios de VHH anti-C5 foram fundidos com um domínio antialbumina para gerar moléculas biespecíficas. Foram avaliados quatro comprimentos diferentes de ligantes (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 106), (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 107), (G₄S)₅ (SEQ ID NO: 108) e (G₄S)₆ (SEQ ID

NO: 109) e duas orientações diferentes (N terminal ou C terminal) do domínio antialbumina. As sequências das moléculas geradas são mostradas na Tabela 18. Os construtos foram expressos em células HEK293F e purificadas usando cromatografia de afinidade com proteína A. As moléculas de fusão purificadas foram avaliadas em experiências Biacore. C5 humano foi biotinizado e imobilizado em um chip biacore, moléculas biespecíficas purificadas foram injetadas para saturar o chip, seguido por três concentrações diferentes de albumina sérica humana para obter a cinética. A afinidade medida com a albumina sérica humana foi usada como representante para comparar os diferentes comprimentos dos ligantes. $(G_4S)_3$ foi escolhido como o comprimento ideal do ligante para gerar fusões biespecíficas. A fusão antialbumina N ou C terminais também foi avaliada na mesma experiência. Diferentes orientações foram consideradas ótimas para diferentes domínios de VHH anti-C5.

Tabela 18. Sequências de Variantes de extensão e orientação do ligante de anti-C5/antialbumina biespecíficos

Nome	Sequência	SEQ ID NO
CRL0248	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPPEWSSIS- GSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGLTVTVSS	305
CRL0249	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPPEWSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS	306
CRL0250	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPPEWSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS	307
CRL0251	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSGILSPYAVGWFR- QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTDVSKGRFTISRDNKNSLY- LQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS- FGMSWVRQAPGKGPPEWSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSS	308

CRL0254	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG-GLVQPGGSLRLS CAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTITSGG-SAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVTVSS	309
CRL0255	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG-GLVQPGGSLRLS CAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTITSGG-SAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVTVSS	310
CRL0256	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSGILSPYAVGWFRQAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTR- RYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVTVSS	311
CRL0257	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSGILSPYAVGWFR-QAPGKGLEFVSTITSGGSAIYTD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVRTRRYGSNLGEVPQENEYGYWGQGT LVTVSS	312
CRL0272	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSS	313
CRL0273	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSS	314
CRL0274	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSS	315
CRL0275	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFR-QAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSS	316
CRL0278	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSSMRSDSYDYWGQGT LVTVSS	317
CRL0279	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFRSFGMSWVR-QAPGKGP EWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC-TIGGSLSRSSQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRAFS DYAMAWFRQAPGQEREFVAGIGWSSGDTLYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQQQYIYSS-MRSDSYDYWGQGT LVTVSS	318

CRL0280	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFRQAPGQEREFVAGIG- WGGDTLYADSVRGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGTTLTVSS	319
CRL0281	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVR- QAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC- TIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSYAMAWFR- QAPGQEREFVAGIGWGGDTLYADSVRGRFTISR- NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARQGQYIYSS- MRSDSYDYWGQGTTLTVSS	320

[00166] Uma série de diferentes moléculas de fusão biespecíficas foi gerada com domínios de VHH anti-C5 humanizados com ou sem ligação dependente do pH. Os domínios de VHH anti-C5 foram fundidos com dois domínios antialbumina diferentes para gerar moléculas biespecíficas (mostradas na Tabela 9). Estes construtos foram expressos em células HEK293F e purificados utilizando cromatografia de proteína A. Biespecíficas purificados foram testadas em ensaios de hemólise e os resultados são mostrados nas FIGS. 3A-D.

[00167] Quatro moléculas biespecíficas CRL0483, CRL0484, CRL0499 e CRL0500 foram priorizadas com base em ensaios funcionais e de ligação. As medições de afinidade por Biacore para ligação ao C5 humano para CRL0483, CRL0484, CRL0499 e CRL0500 são mostradas na Tabela 10 e avaliações funcionais nas Figuras 5, 6 e 7. Estas quatro moléculas biespecíficas foram avaliadas em estudos farmacocinéticos in vivo em macacos cynomolgus.

Exemplo 17. Análise farmacocinética de moléculas de fusão biespecíficas

[00168] As proteínas purificadas foram administradas em 10 mg/kg por via intravenosa ou subcutânea em macacos cynomolgus. Foram utilizados três macacos por grupo de dose por artigo de teste. A farmacocinética de moléculas biespecíficas foi medida por um ensaio de quantificação baseado em LC-MS usando peptídeos de assinatura específicos para cada construto. Os perfis de PK são mostrados nas

FIGS. 6A e 6B e os parâmetros estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros de PK depois de 10 mg/kg de artigos de teste em macacos cynomolgus.

Artigo de teste	t _{1/2} h	t _{max} h	C _{max} µg/mL	AUC h*µg/mL	C _L mL/h/kg	V mL/kg	F %
CRL0483 IV	139	1,33	324	47900	0,211	42,0	
CRL0484 IV	125	1	382	43700	0,238	43,0	
CRL0483 SC	103	20	238	46412	0,218	32,5	97
CRL0484 SC	75,9	24	161	32610	0,315	34,9	75
CRL0499 IV	170	2,11	299	53773	0,184	46,9	
CRL0500 IV	239	0,167	351	51929	0,205	62,5	
CRL0499 SC	220	32	146	58666	0,173	54,2	109
CRL0500 SC	209	32	161	61475	0,163	49,0	118

[00169] Embora a descrição descreva várias modalidades, deve ser entendido que variações e modificações ocorrerão para aqueles versados na técnica. Portanto, é pretendido que as reivindicações anexas abrangam todas essas variações equivalentes. Além disso, os títulos das seções aqui utilizados são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito.

[00170] Cada modalidade aqui descrita pode ser combinada com qualquer outra modalidade ou modalidades, a menos que claramente indicado em contrário. Em particular, qualquer característica ou modalidade indicada como preferida ou vantajosa pode ser combinada com qualquer outra característica ou características ou modalidade ou modalidade indicadas como preferidas ou vantajosas, a menos que claramente indicado em contrário.

[00171] Todas as referências citadas neste pedido estão expressamente incorporadas por referência aqui.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano e um polipeptídeo manipulado que se liga especificamente a albumina sérica humana, em que o polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano está fundido ao polipeptídeo manipulado que se liga especificamente a albumina sérica humana diretamente ou através de um ligante peptídico.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o resíduo C terminal do polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana é fundida diretamente ou através de um ligante através do resíduo N terminal do polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano.

3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o resíduo C terminal do polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano é fundido diretamente ou através de um ligante através do resíduo N terminal do polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana.

4. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 1 a 12 e seus fragmentos; e o polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 22 a 34 e seus fragmentos.

5. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 4, ca-

racterizada pelo fato de que o polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:11 e polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

6. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o ligante peptídico tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:102 ou 103.

7. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o ligante peptídico tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:102.

8. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência que é pelo menos 95% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:96 a 101.

9. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:96 a 101.

10. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão consiste em uma sequência de SEQ ID NO:96.

11. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que a CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 13-17, CDR2 compreende um amino sequência de ácidos de SEQ ID NO: 18 ou 19 e CDR3 compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 ou 21.

12. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que polipeptídeo que se liga especificamente à albumina sérica humana compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 35-43, CDR2 compreende qualquer uma de as sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 44-51 e CDR3 compreendem qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 52-63.

13. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada um ou ambos os polipeptídeos que se ligam ao componente C5 do complemento humano ou à albumina humana se ligam de uma maneira dependente do pH.

14. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender hialuronidase.

16. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

17. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 16.

18. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de compreender a molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 16.

19. Célula hospedeira isolada, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de expressão como definido na reivindicação 17.

20. Célula hospedeira isolada de acordo com a reivindica-

ção 19, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero ou uma célula de levedura.

21. Polipeptídeo manipulado que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:1 a 12.

22. Polipeptídeo manipulado de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:1 a 12 e seus fragmentos.

23. Polipeptídeo manipulado que se liga especificamente à albumina sérica humana, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica a uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:22 a 34.

24. Polipeptídeo manipulado de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo manipulado compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOS:22 a 34 e seus fragmentos.

25. Polipeptídeo manipulado de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que polipeptídeo que se liga especificamente ao componente C5 do complemento humano compreende três regiões determinantes de complementaridade, CDR1, CDR2 e CDR3, em que a CDR1 compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 35 a 43, CDR2 compreende um amino sequência de ácidos de SEQ ID NO: 44 a 51 e CDR3 compreende sequências de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 a 63.

26. Polipeptídeo manipulado de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que polipeptídeo se liga especificamente

ao mesmo epítopo sobre a albumina sérica humana com Alb 1.

27. Método para fazer uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de compreender expressar em uma célula hospedeira pelo menos uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão.

28. Kit terapêutico caracterizado pelo fato de compreender:

(a) um recipiente que compreende um rótulo; e

(b) uma composição que compreende a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13;

em que o rótulo indica que a composição deve ser administrada a um paciente que tem ou que é suspeito de ter, um distúrbio mediado pelo complemento.

29. Kit de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de compreender hialuronidase.

30. Método de tratamento de um paciente que possui um distúrbio mediado pelo complemento, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o distúrbio mediado pelo complemento é selecionado do grupo que consiste em: artrite reumatoide; nefrite lúpica; asma; lesão de isquemia-reperfusão; síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS); doença de depósito denso; hemoglobinúria paroxística noturna; degeneração macular; hemólise, síndrome com enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas (HELLP); síndrome de Guillain-Barré; Síndrome de CHAPLE; miastenia gravis; neuromielite óptica; microangiopatia trombótica pós-transplante de células-tronco hematopoiéticas (pós-HSCT-TMA); TMA pós-transplante de medula óssea (TMA pós-

BMT); Doença de Degos; Doença de Gaucher; glomerulonefrite; púrpura trombocitopênica trombótica; perda fetal espontânea; vasculite imune de Pauci; epidermólise bolhosa; perda fetal recorrente; esclerose múltipla (MS); traumatismo craniano; e lesão resultante de infarto do miocárdio, circulação extracorpórea e hemodiálise.

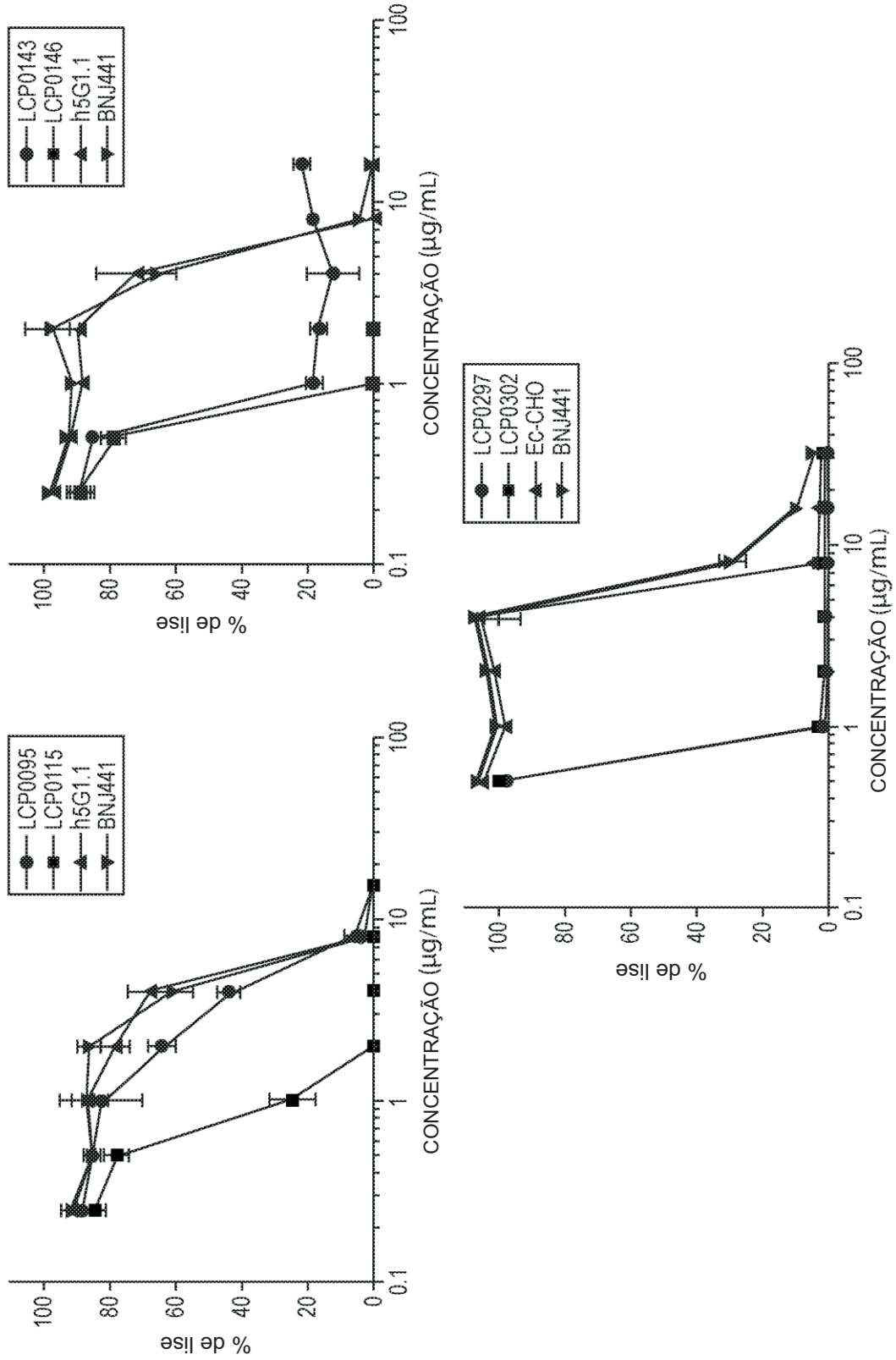


FIG. 1A

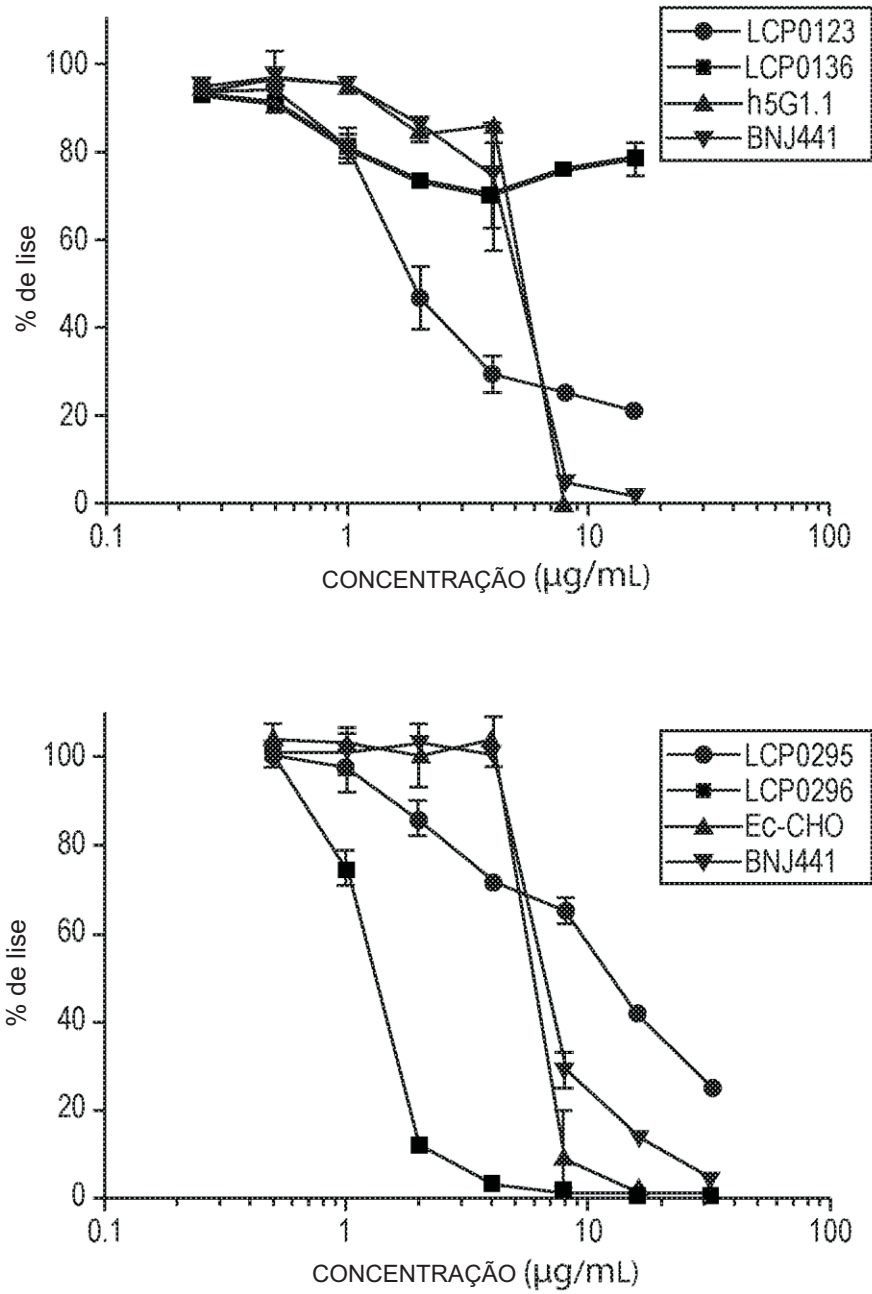


FIG. 1B

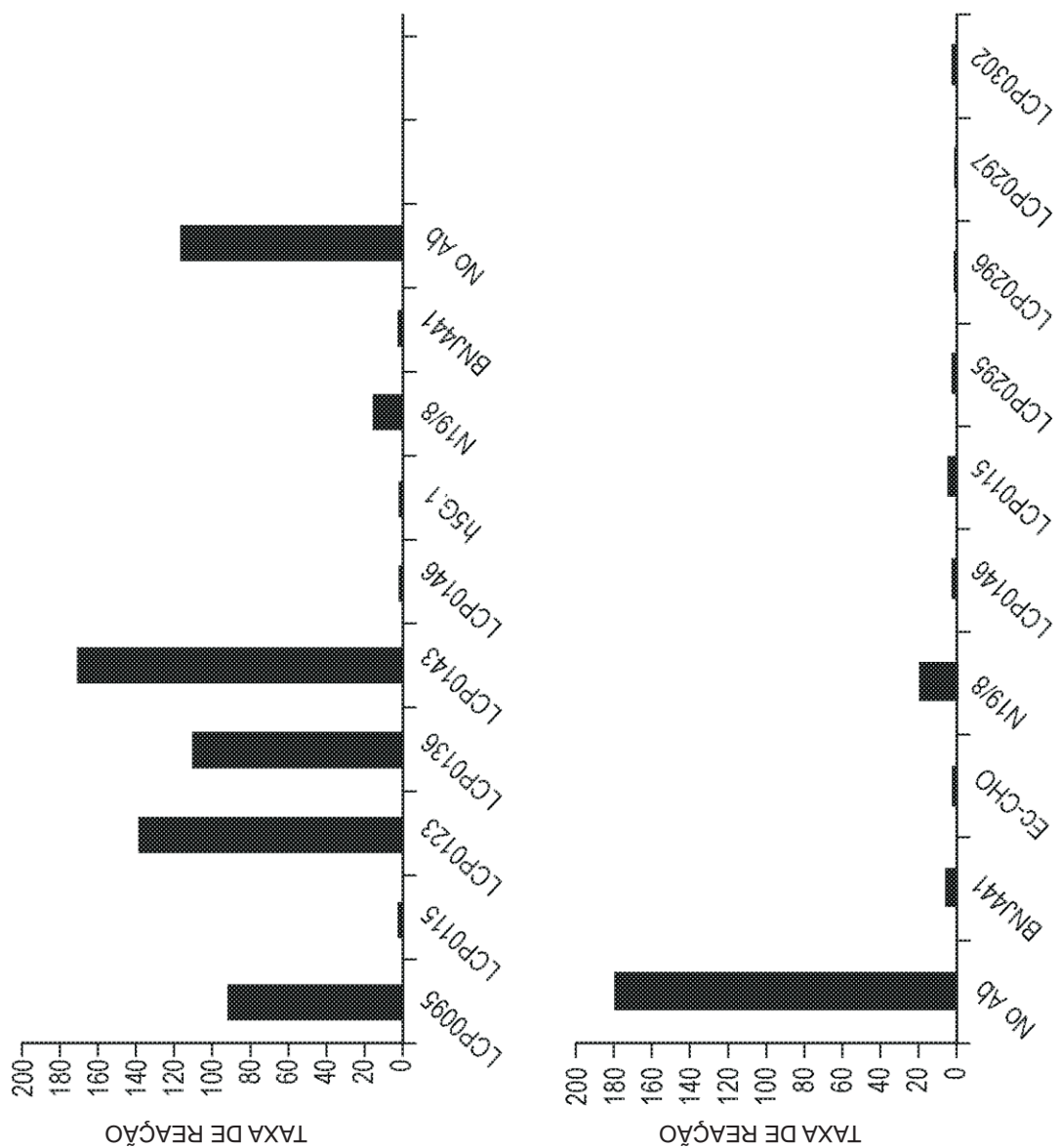


FIG. 2

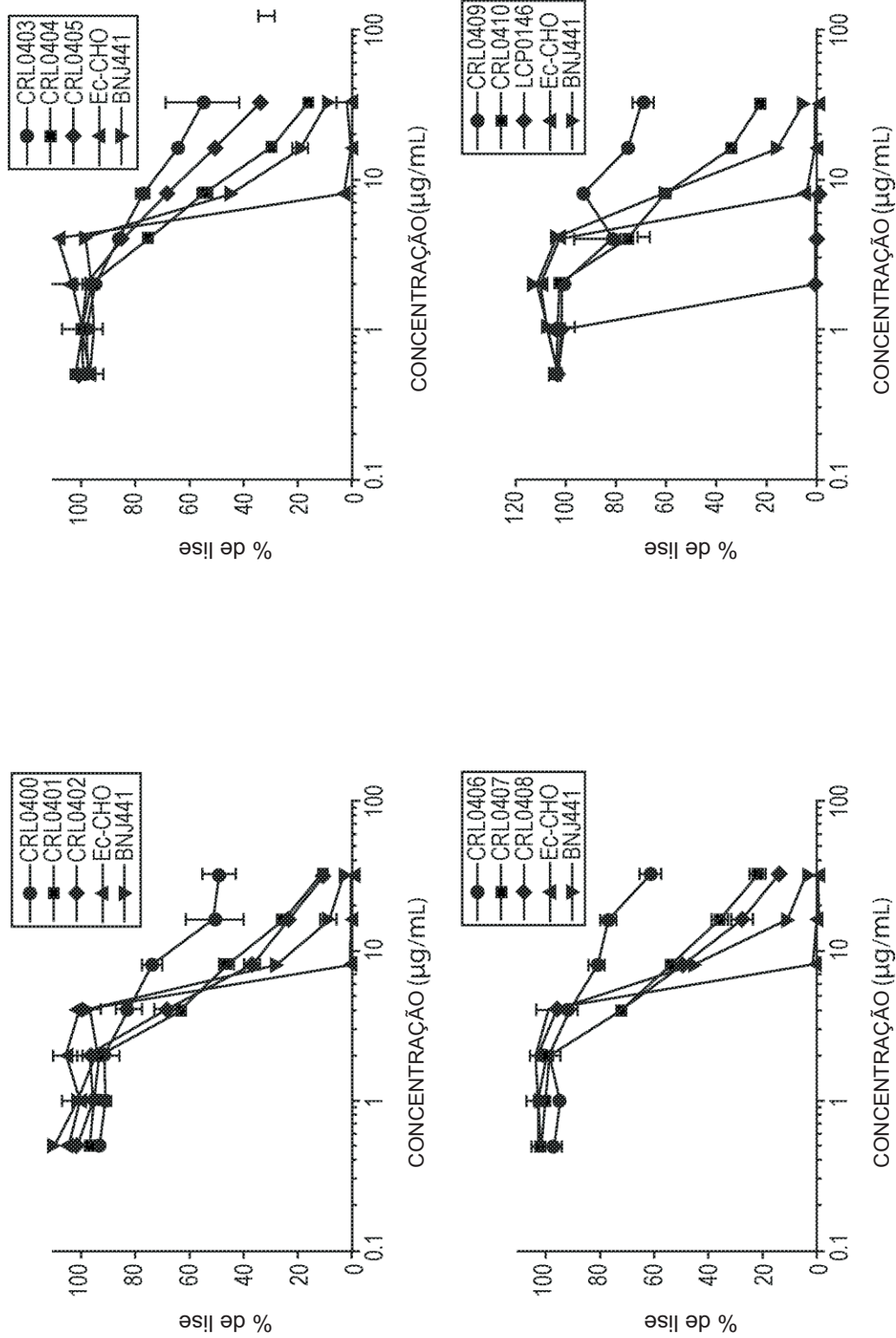


FIG. 3A

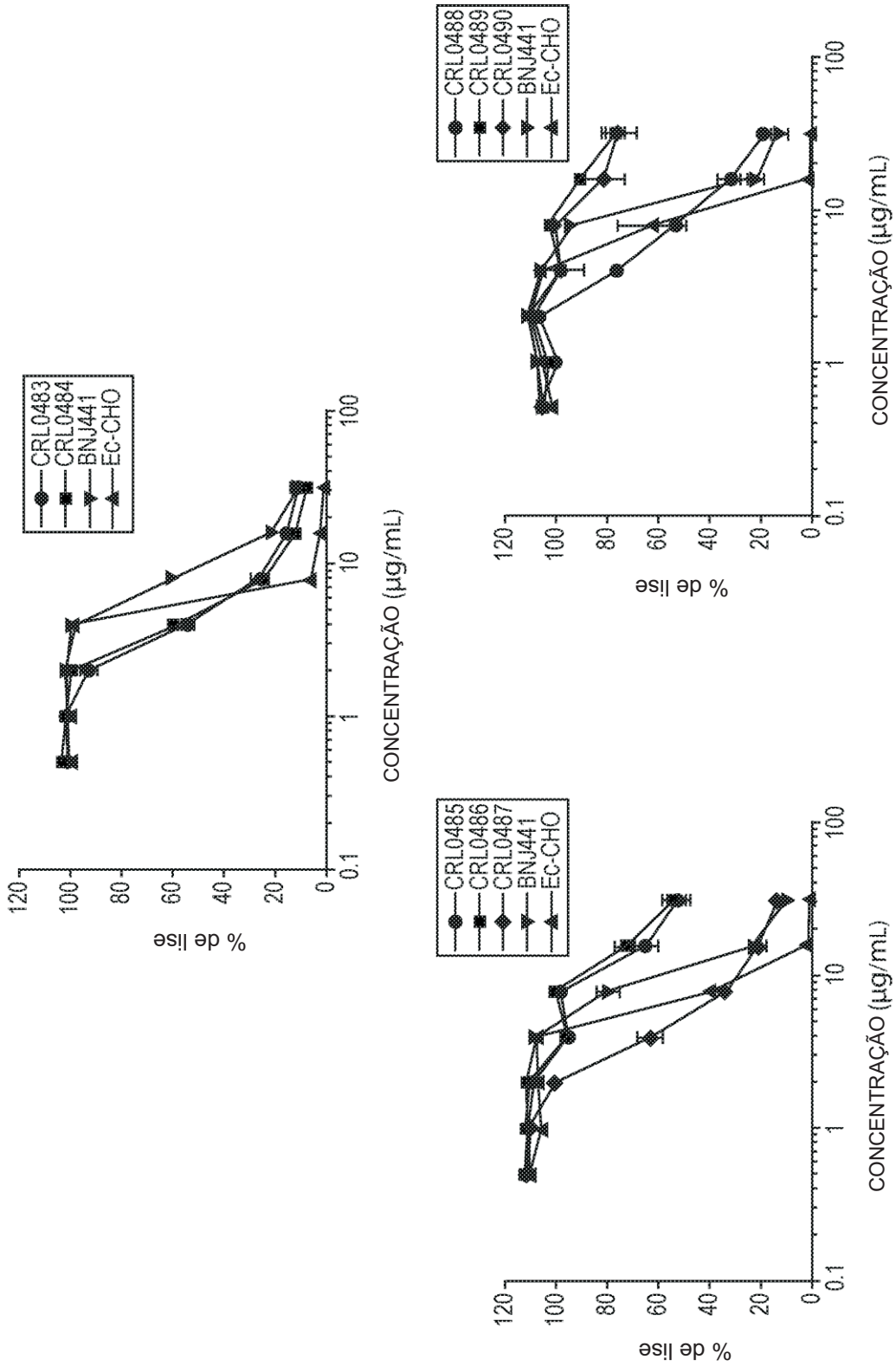


FIG. 3B

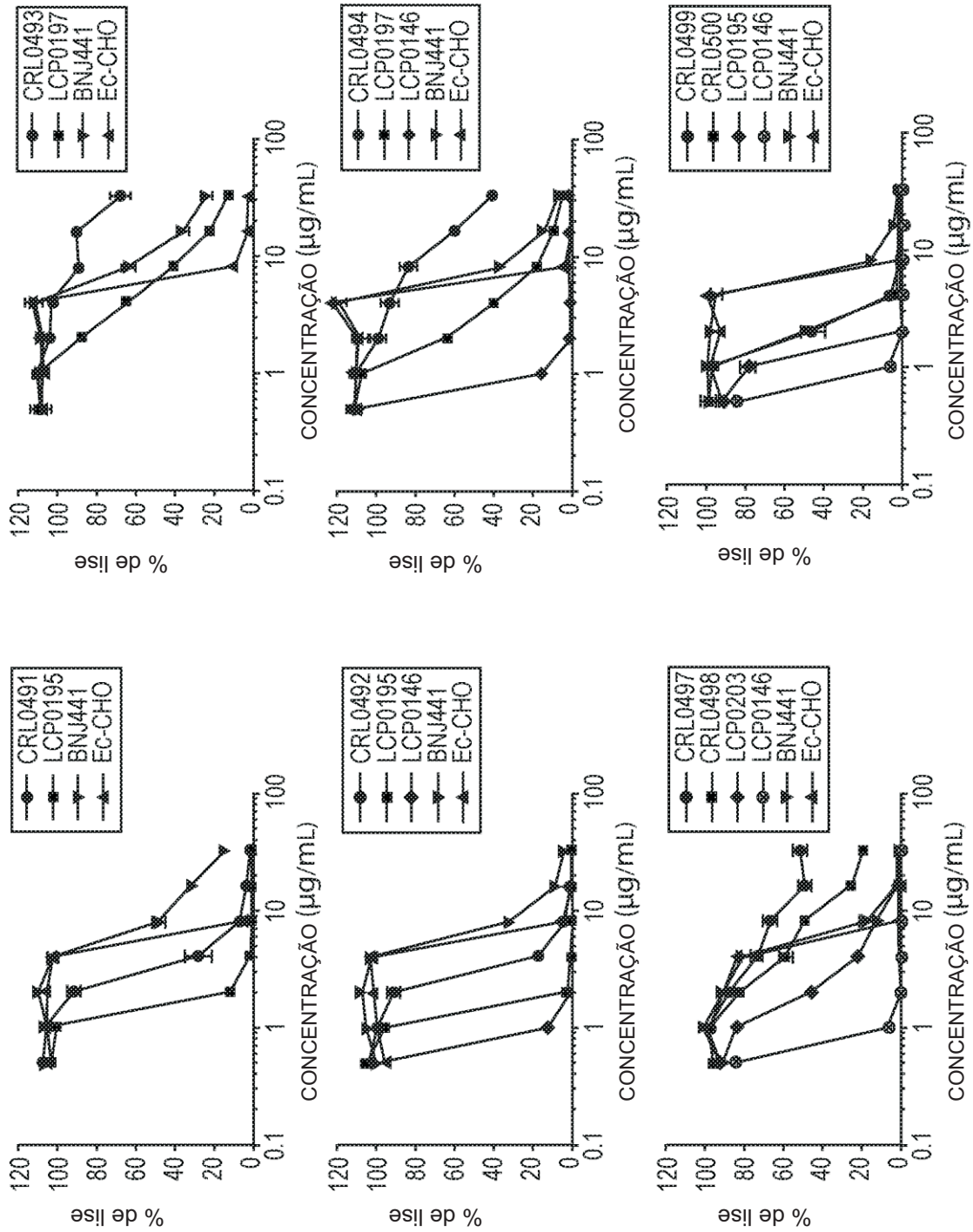


FIG. 3C

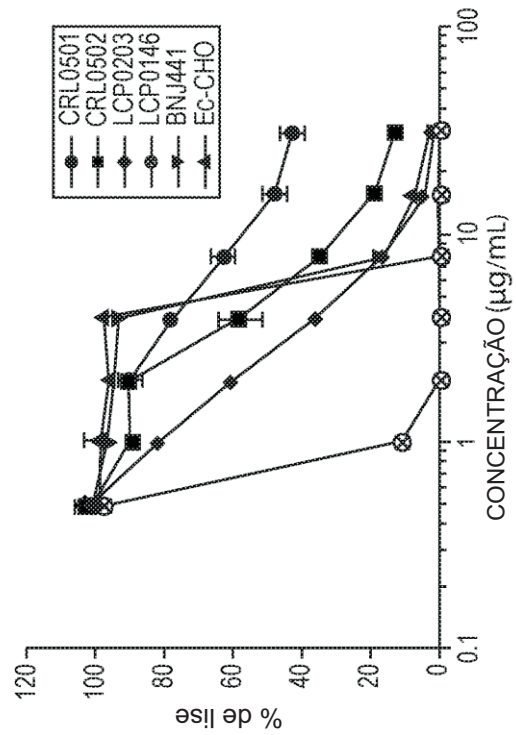
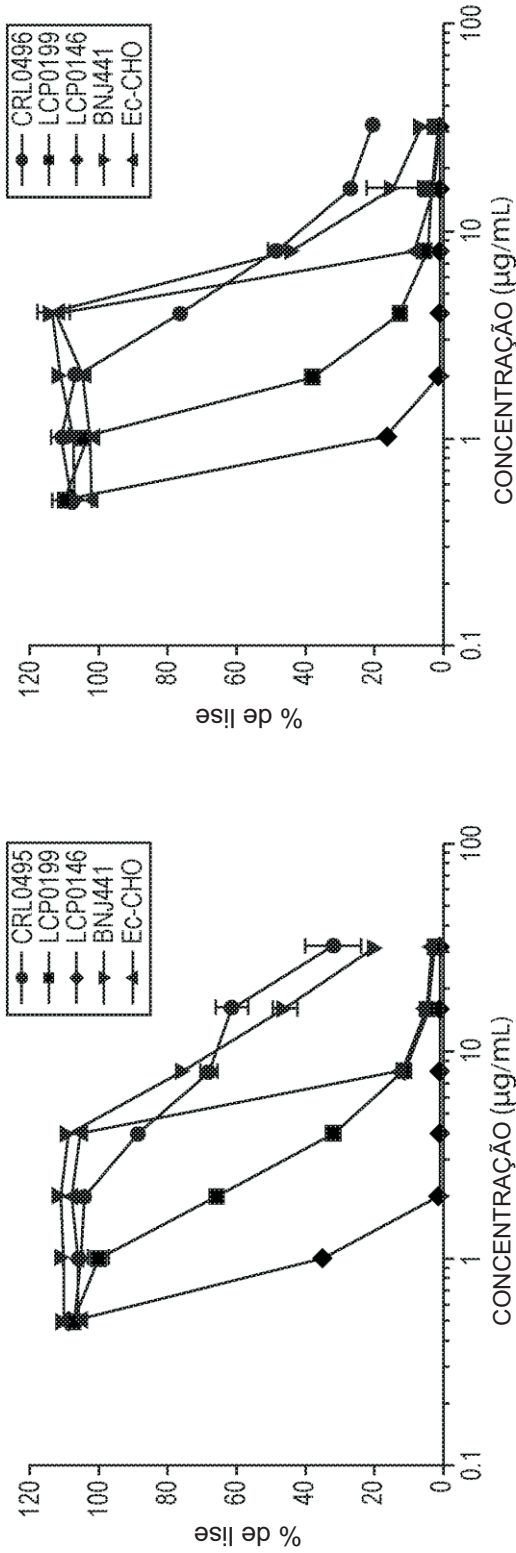


FIG. 3D

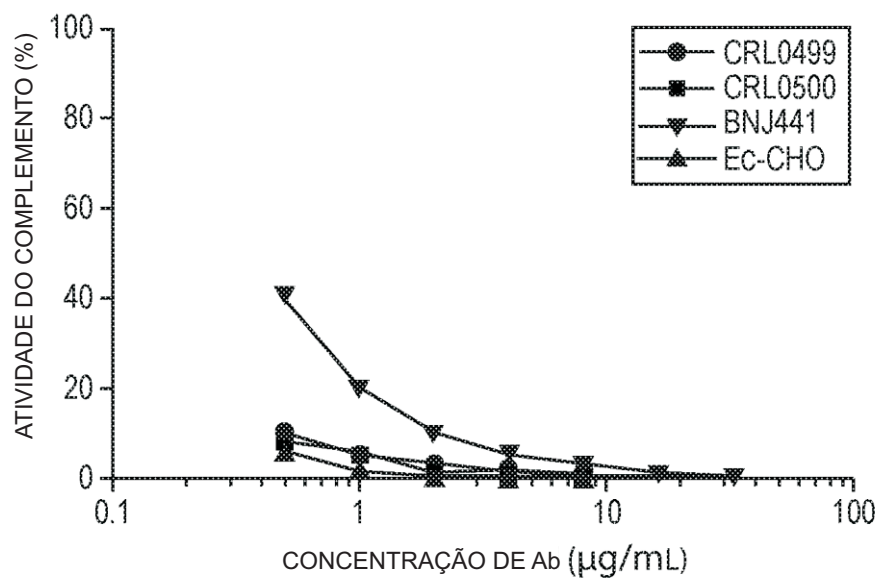
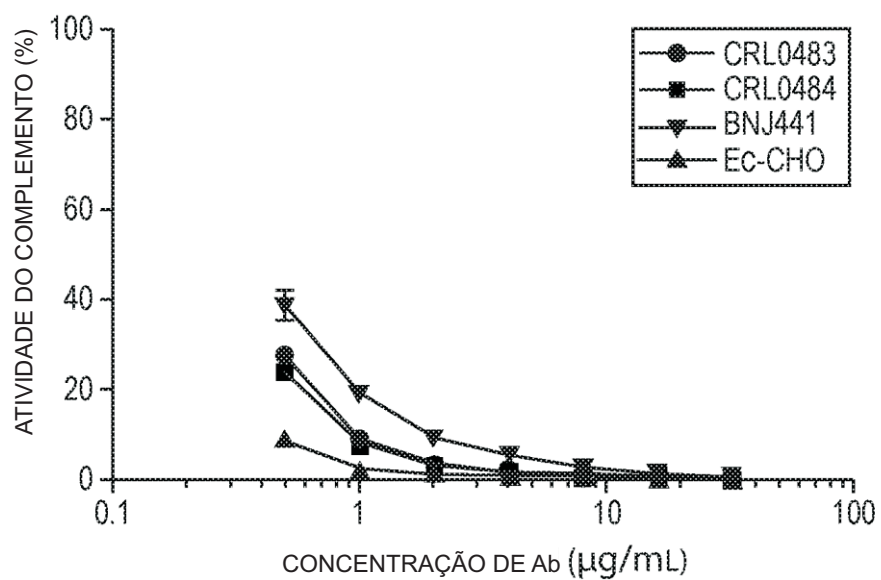


FIG. 4

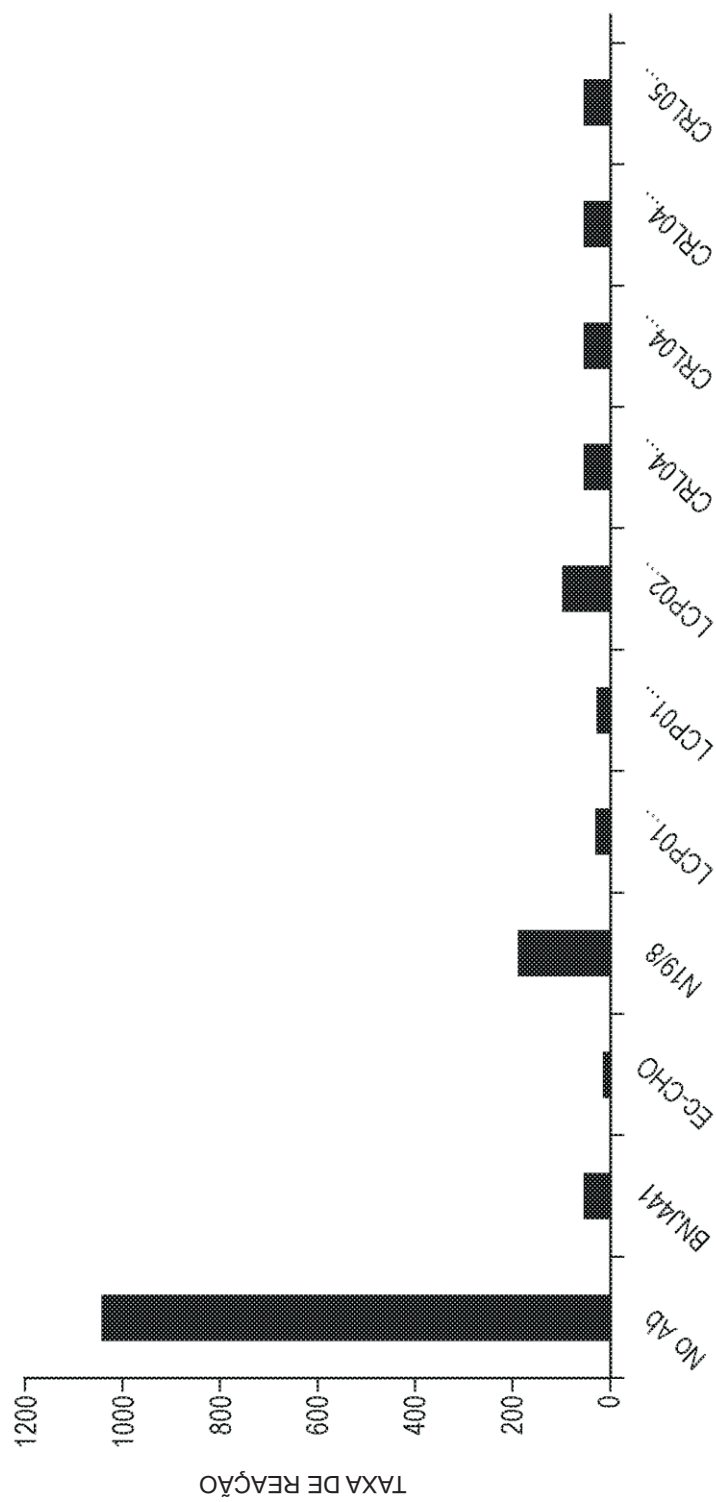


FIG. 5

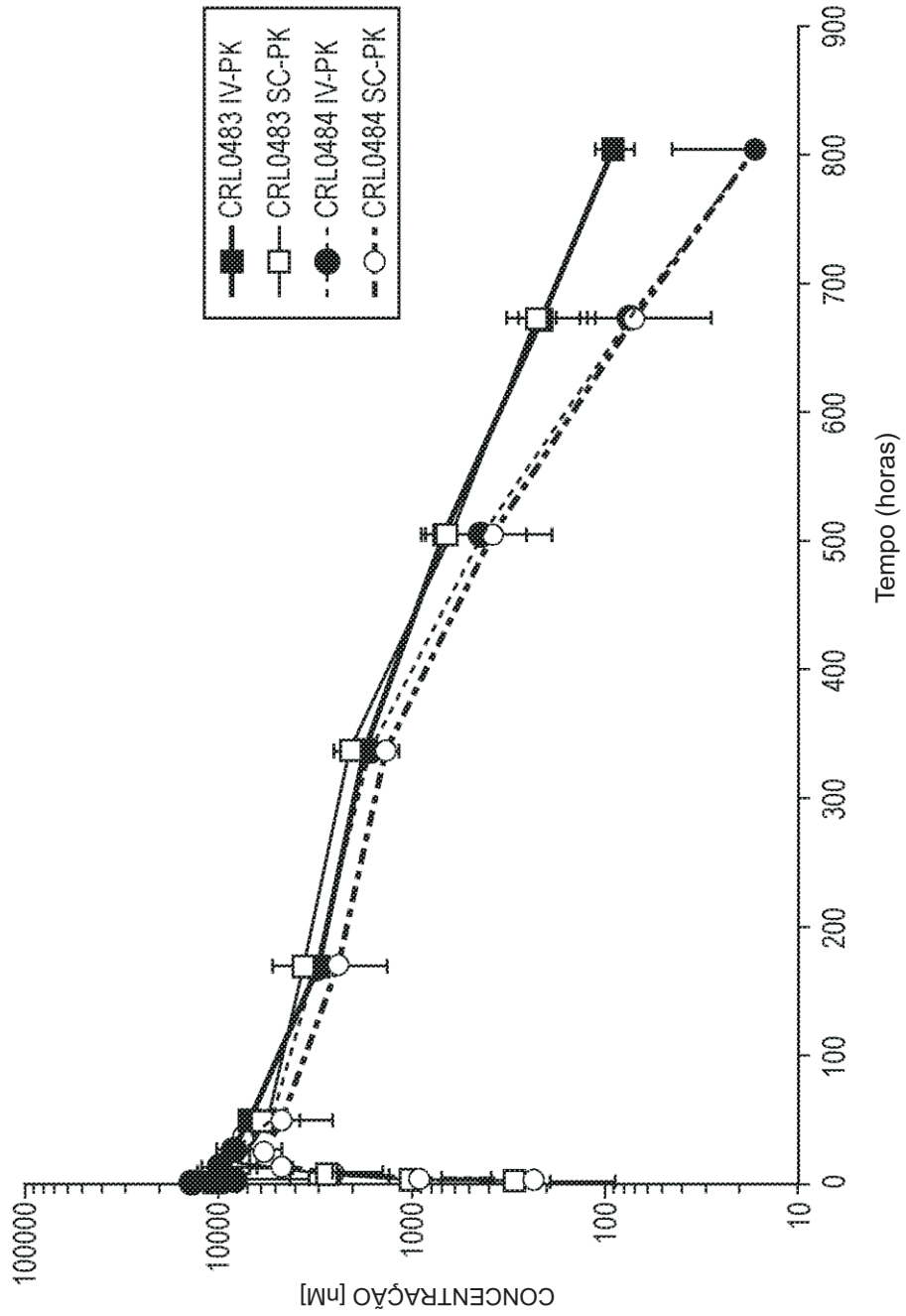


FIG. 6A

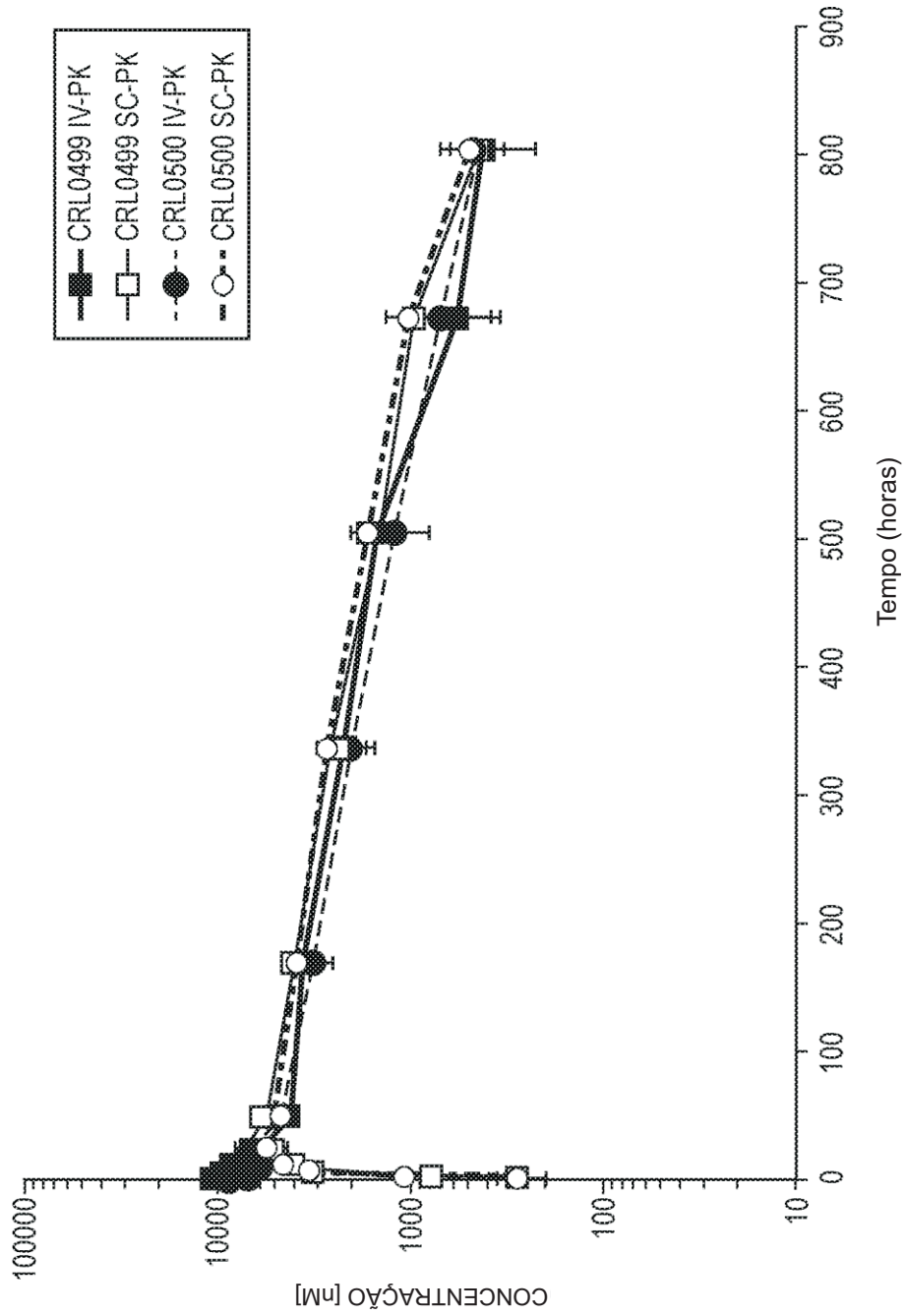


FIG. 6B

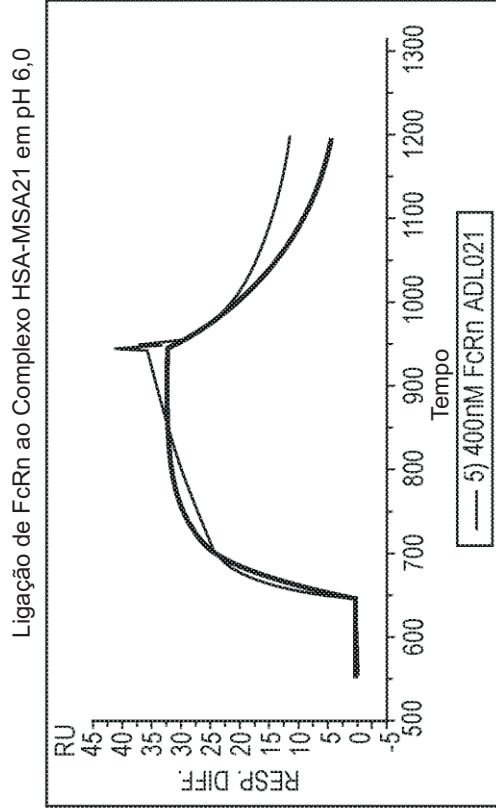


FIG. 7B

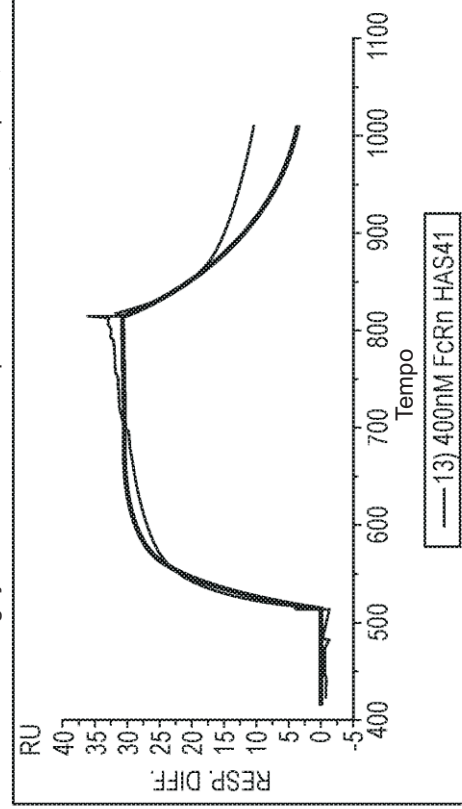


FIG. 7D

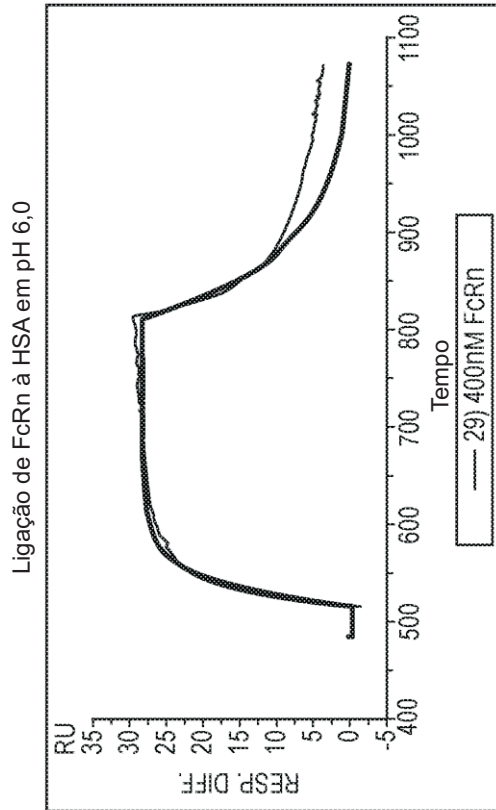


FIG. 7A

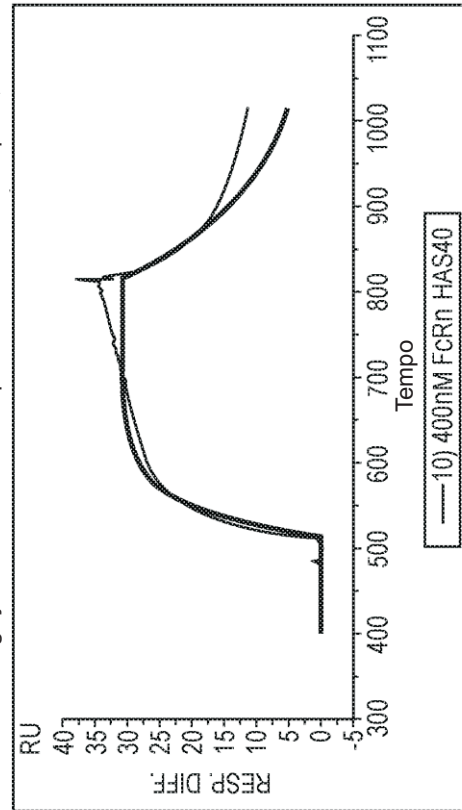


FIG. 7C

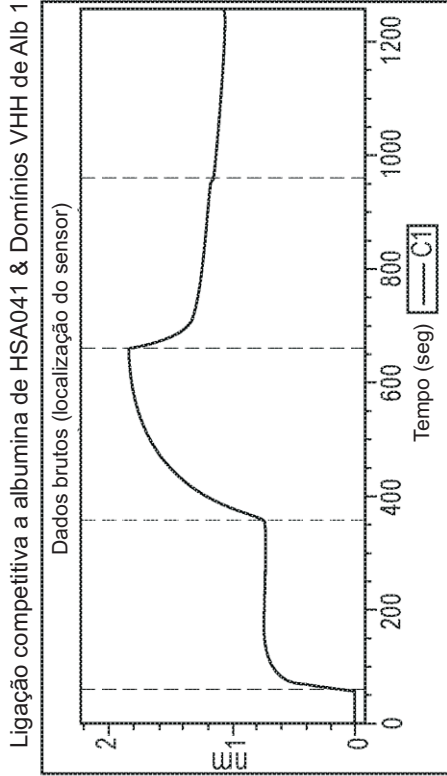


FIG. 8B

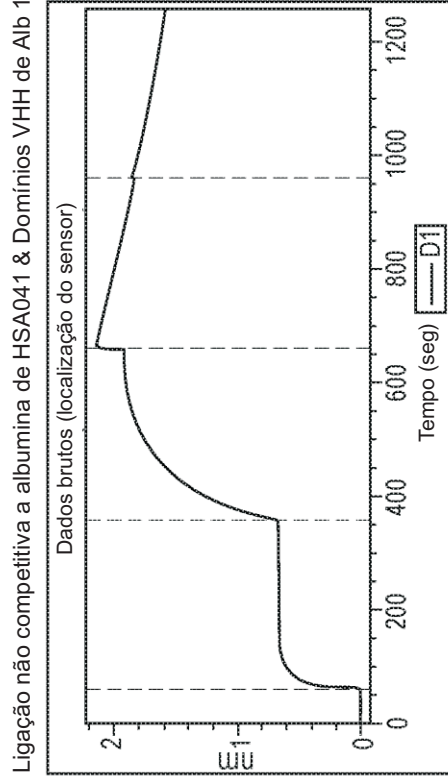


FIG. 8D

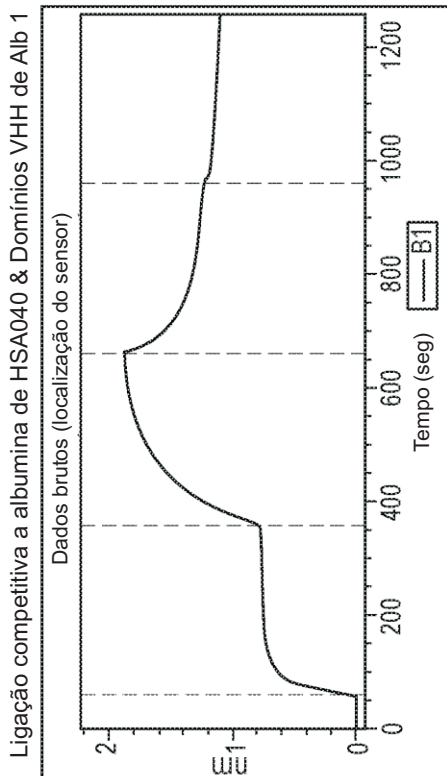


FIG. 8A

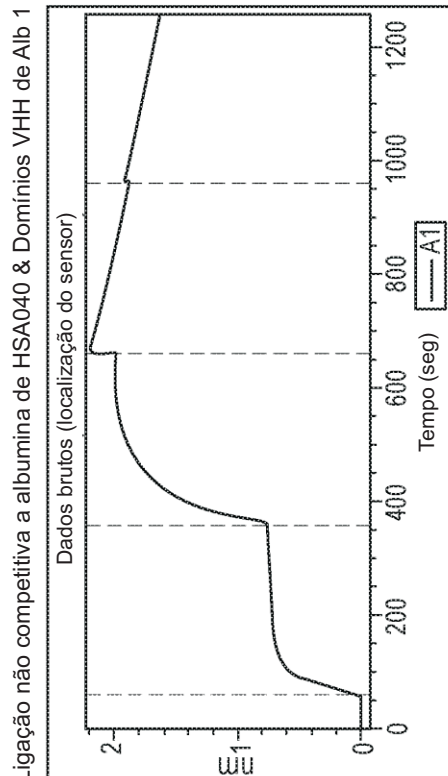


FIG. 8C

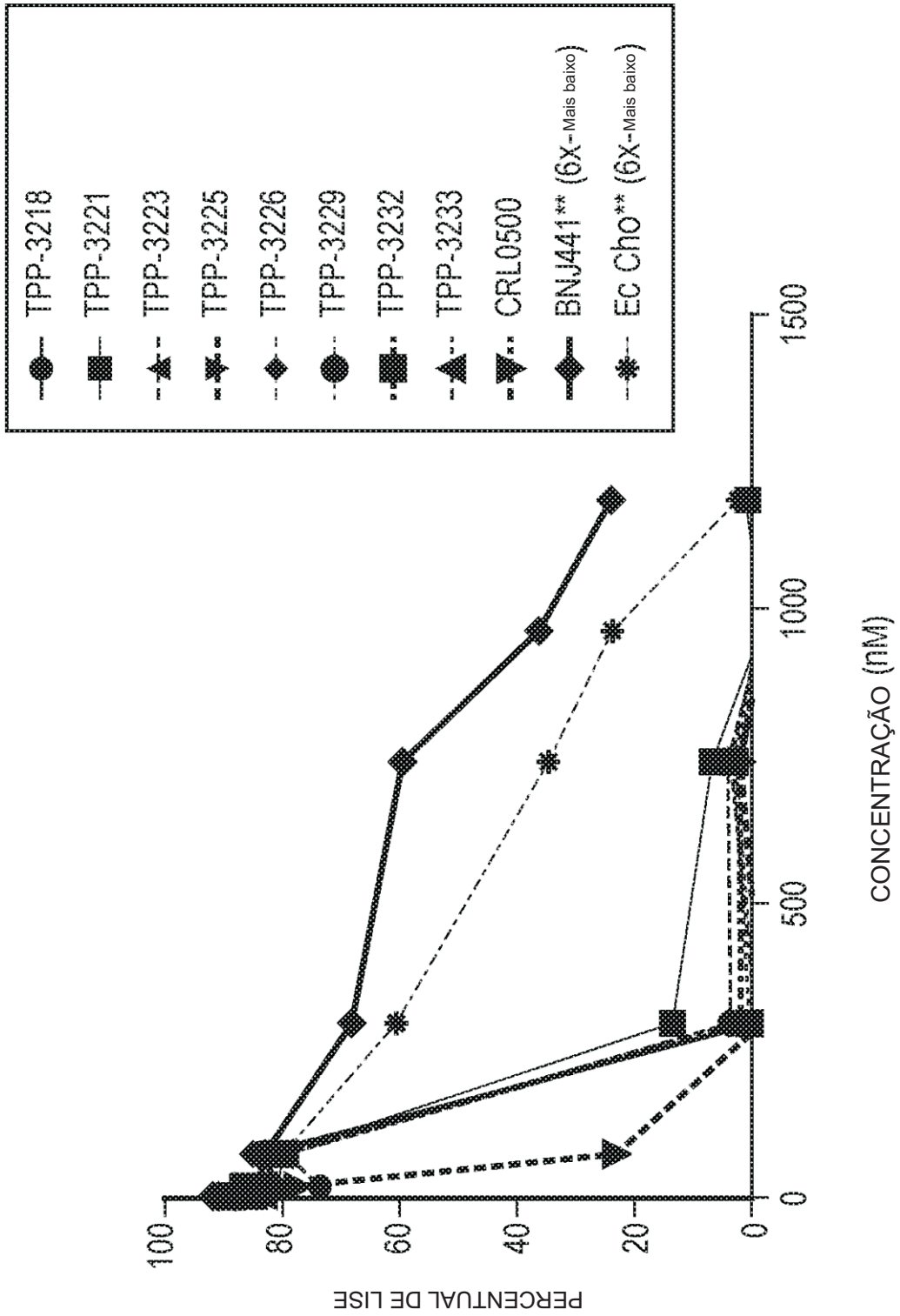


FIG. 9A

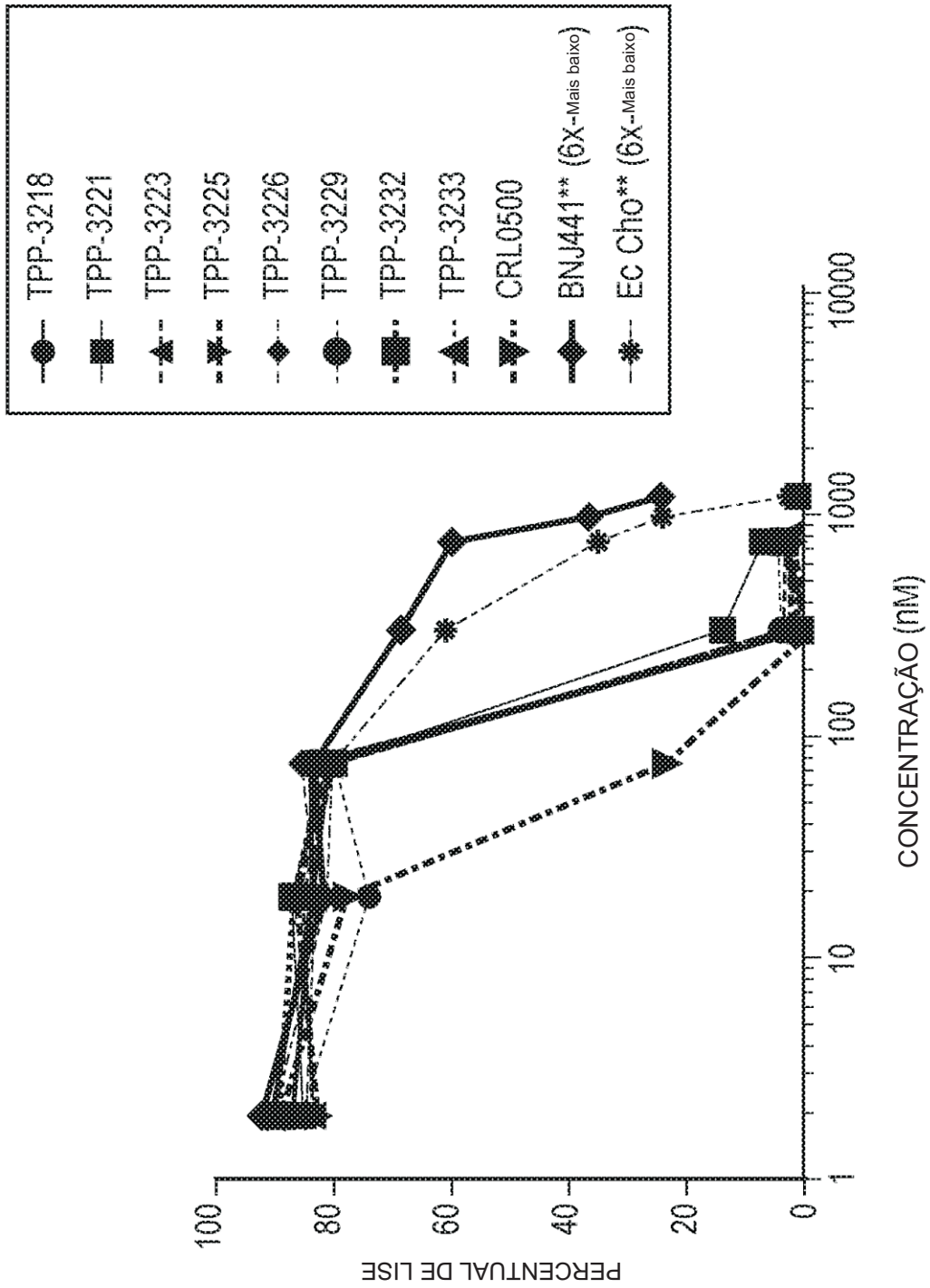


FIG. 9B

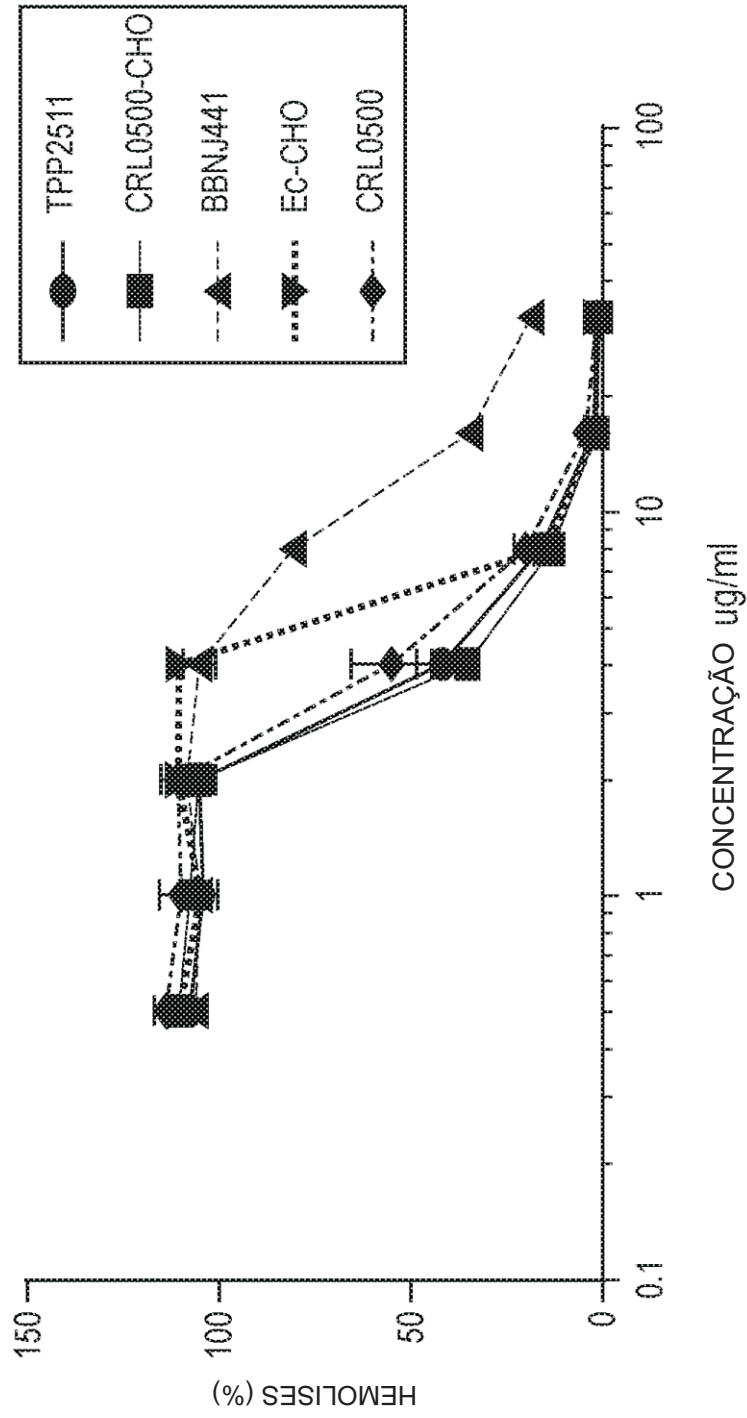


FIG. 10

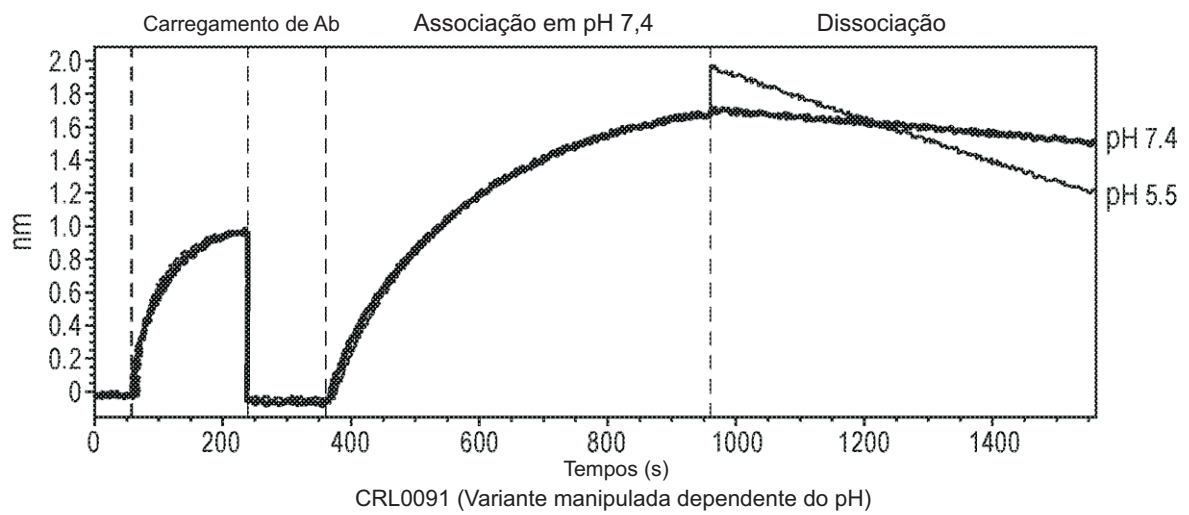
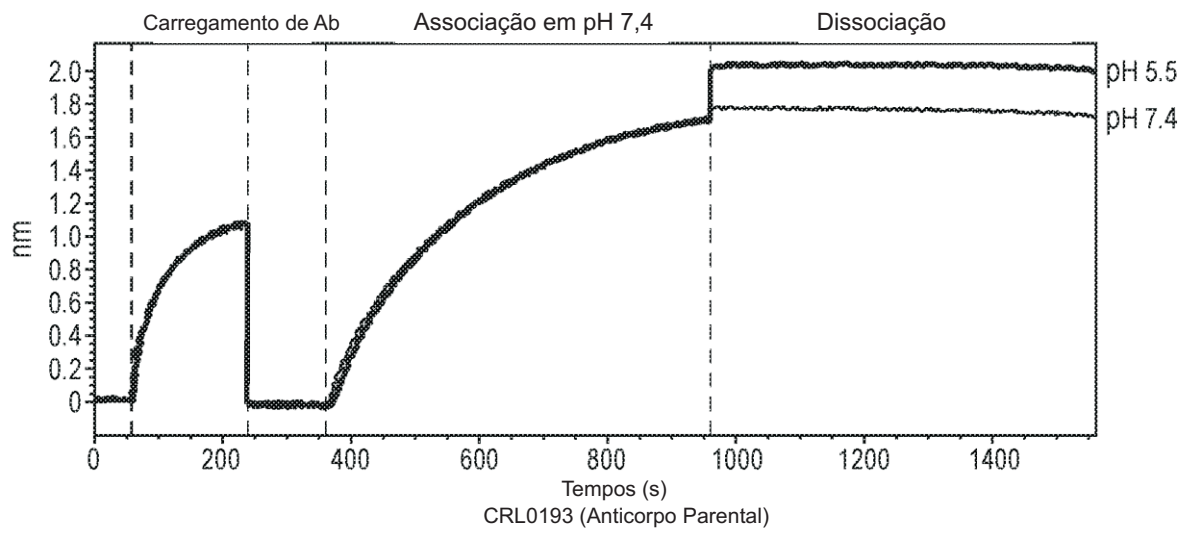


FIG. 11A

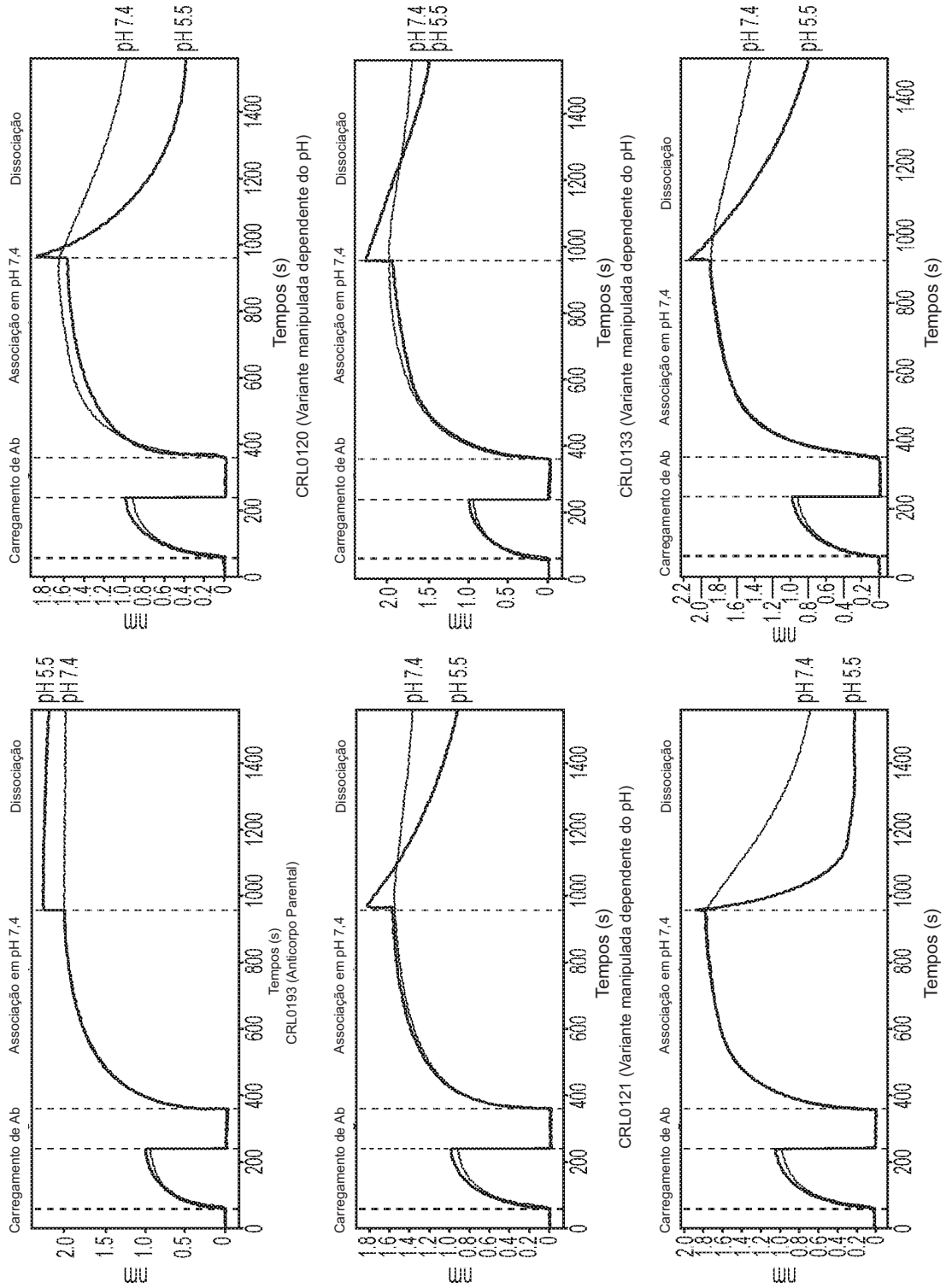


FIG. 11B

CRL0120 (Variante manipulada dependente do pH)

CRL0133 (Variante manipulada dependente do pH)

CRL0144 (Variante manipulada dependente do pH)

CRL0193 (Anticorpo Parental)

CRL0121 (Variante manipulada dependente do pH)

CRL0135 (Variante manipulada dependente do pH)

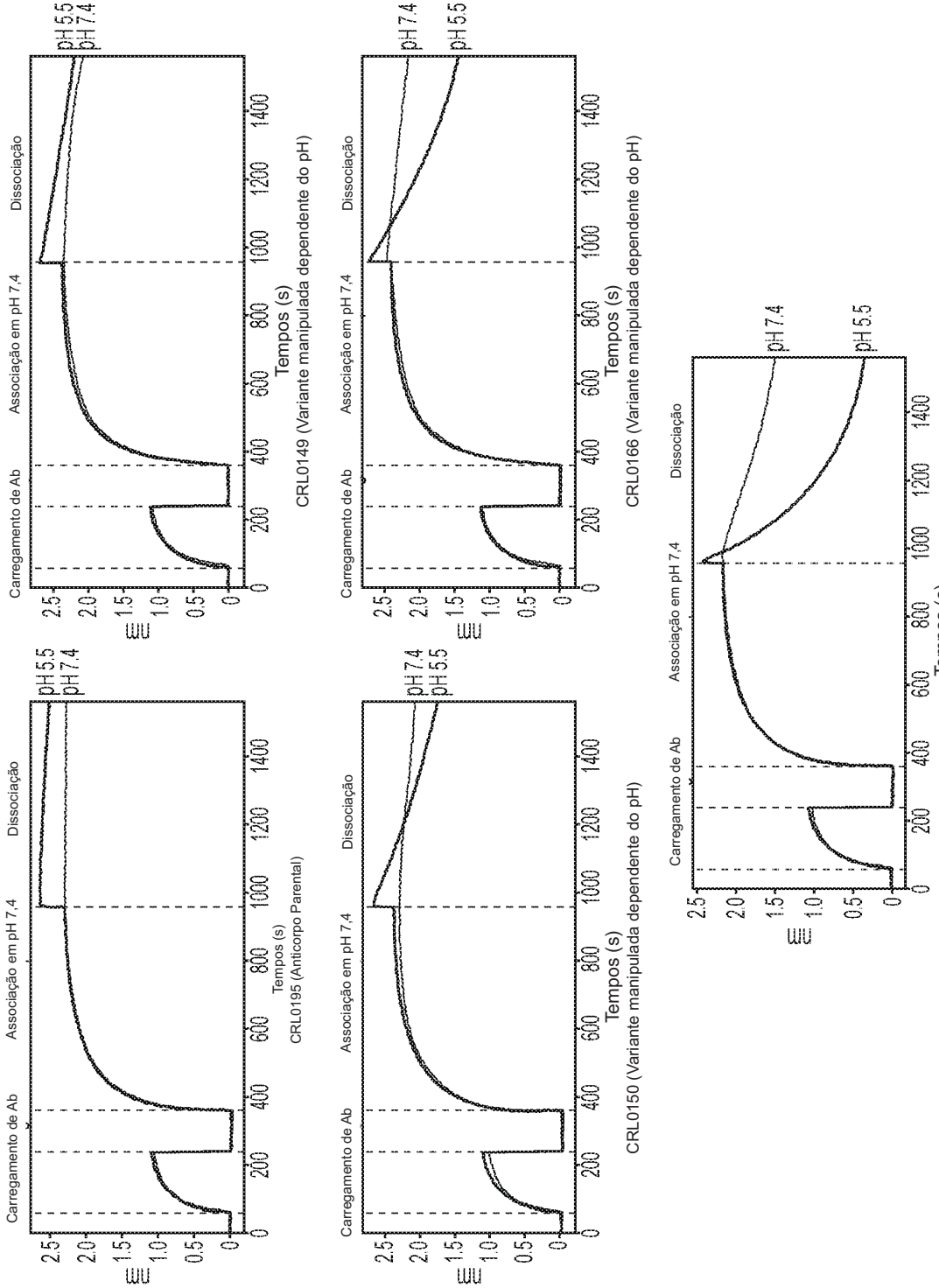


FIG. 11C

FIG. 11C

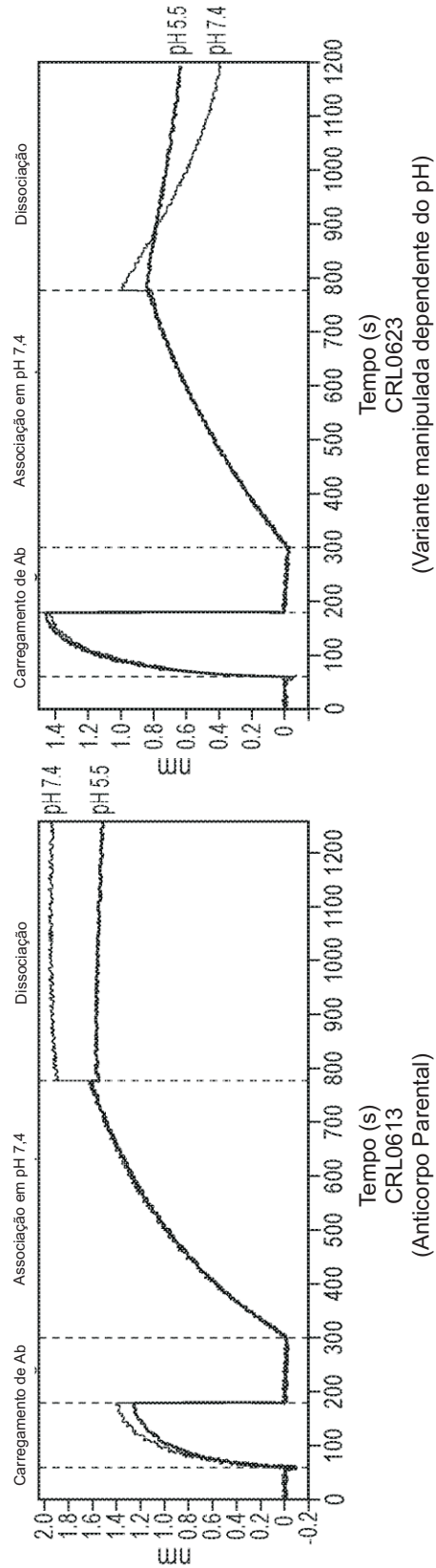


FIG. 11D

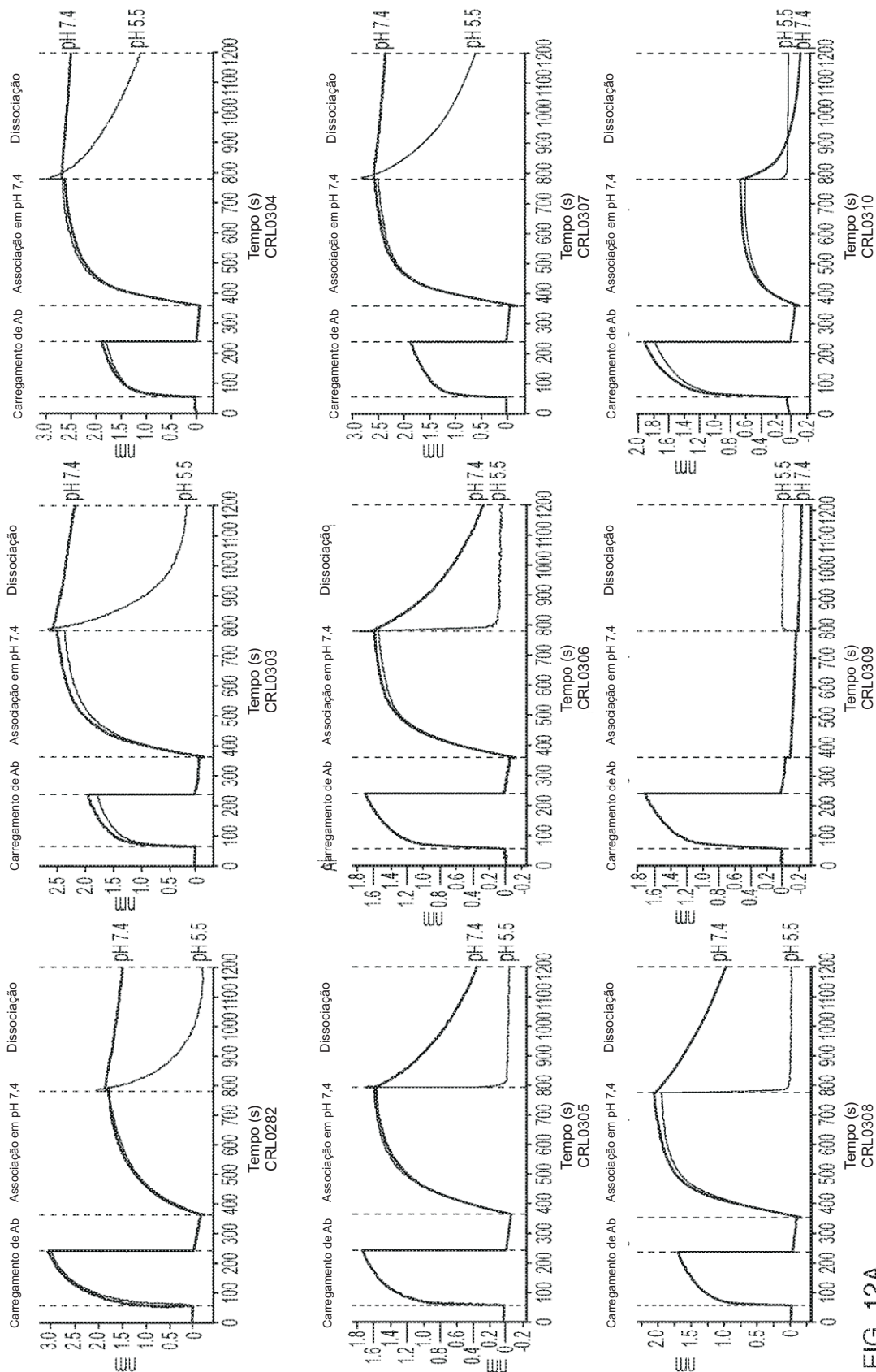


FIG. 12A

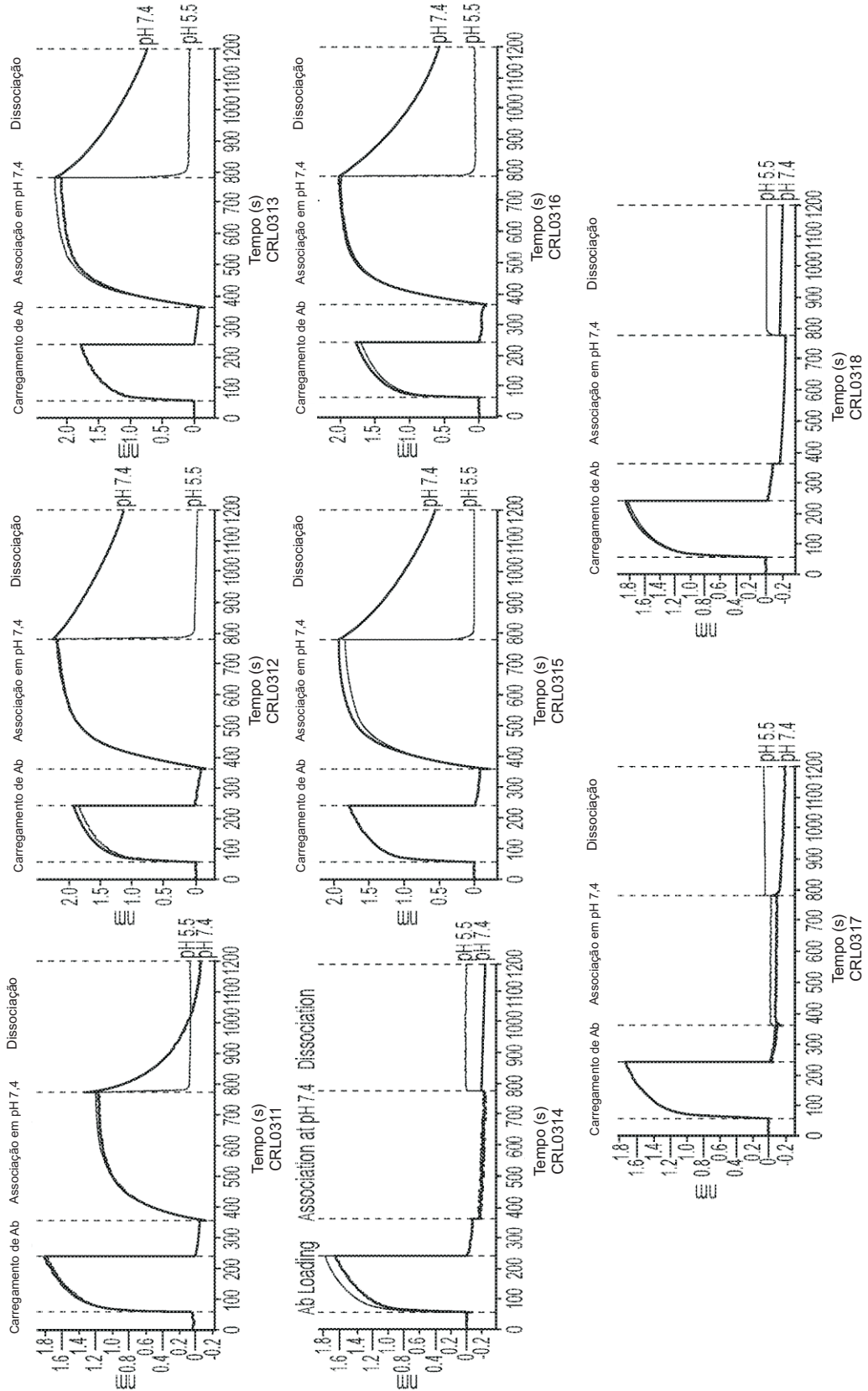


FIG. 12B

RESUMO

Patente de Invenção: **"POLIPEPTÍDEOS QUE SE LIGAM AO COMPONENTE C5 DO COMPLEMENTO OU À ALBUMINA SÉRICA E SUAS PROTEÍNAS DE FUSÃO"**.

A presente invenção refere-se polipeptídeos manipulados que se ligam especificamente ao componente C5 do complemento e/ou albumina sérica humanos. A presente invenção também se refere a proteínas de fusão que compreendem tais polipeptídeos manipulados, em que tais proteínas de fusão podem ser proteínas multivalentes e multiespecíficas. A presente invenção ainda se refere a moléculas de ácido nucleico que codificam tais polipeptídeos manipulados ou tais proteínas de fusão. A descrição ainda fornece composições farmacêuticas que compreendem tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão e métodos de tratamento usando tais polipeptídeos manipulados ou proteínas de fusão.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P244467.txt
- Data de Geração do Código: 30/12/2019
- Hora de Geração do Código: 15:53:31
- Código de Controle:
 - Campo 1: 9E58739B9696CE0E
 - Campo 2: C675D0DDD0329DD9