

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 930**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.1999 E 08018816 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2033659**

54 Título: **Inhibidores de la activación del complemento**

30 Prioridad:

20.02.1998 US 75328 P

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

10.03.2014

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FUNG, MICHAEL S. C.;
SUN, CECILY R. Y. y
SUN, BILL N. C.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 930 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la activación del complemento

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo que es un Fab, (Fab')₂, Fv o Fv monocatenario, que

(i) se une al mismo epítipo sobre factor D humano que el anticuerpo monoclonal 166-32 producido por el hibridoma depositado en la American Type Culture Collection con el número de Registro HB-12476, y

(ii) inhibe la activación del complemento de la ruta alternativa en una relación molar de anticuerpo a factor D de 1,5:1.

10 Antecedentes de la invención

El sistema del complemento desempeña un papel central en el aclaramiento de inmunocomplejos y en la inmunorrespuesta frente a agentes infecciosos, antígenos extraños, células infectadas por virus y células tumorales. Sin embargo, el complemento también participa en la inflamación patológica y en enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, la inhibición de una activación excesiva o incontrolada de la cascada del complemento podría proporcionar beneficios clínicos a pacientes con esas enfermedades y situaciones.

15 El sistema del complemento abarca dos rutas de activación diferentes, denominadas la ruta clásica y la ruta alternativa (V.M. Holers, En *Clinical Immunology: Principles and Practice*, Compilador R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391). La ruta clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio que normalmente se activa por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La ruta alternativa es una cascada dependiente de magnesio que se activa por el depósito y la activación de C3 sobre determinadas superficies susceptibles (p. ej., sobre polisacáridos de la pared celular de levaduras y bacterias, y sobre determinados materiales biopoliméricos). La activación de la ruta del complemento genera fragmentos biológicamente activos de las proteínas del complemento, p. ej., las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a, y los complejos C5b-9 de ataque a la membrana (MAC), que median en actividades inflamatorias en las que participan la quimiotaxis leucocitaria, activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células cebadas y células endoteliales, permeabilidad vascular, citolisis y daño tisular.

20 El factor D es una serina-proteasa muy específica, esencial para la activación de la ruta alternativa del complemento. Escinde el factor B unido a C3b, generando la enzima C3b/Bb que es el componente activo de las convertasas C3/C5 de la ruta alternativa. El factor D puede ser una diana adecuada para la inhibición, debido a que su concentración plasmática en seres humanos es muy baja (1,8 µg/ml) y se ha demostrado que es la enzima limitante de la activación de la ruta alternativa del complemento (P.H. Lesavre y H.J. Müller-Eberhard. *J. Exp. Med.*, 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis y col., *New Eng. J. Med.*, 1985; 312: 395-401).

25 Se ha demostrado que la regulación por disminución de la activación del complemento es efectiva en el tratamiento de varias indicaciones de enfermedades en modelos animales y en estudios *ex vivo*, p. ej., lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Y. Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1996, 93: 8563-8568), artritis reumatoide (Y. Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92: 8955-8959), circulación extracorpórea cardiopulmonar y hemodiálisis (C.S. Rinder, *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1564-1572), rechazo hiperagudo en el trasplante de órganos (T.J. Kroshus y col., *Transplantation*, 1995; 60: 1194-1202), infarto de miocardio (J.W. Homeister y col., *J. Immunol.*, 1993; 150: 1055-1064; H.F. Weisman y col., *Science*, 1990; 249: 146-151), daño producido por reperfusión (E.A. Amsterdam y col., *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: H448-H457), y síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (R. Rabinovici y col., *J. Immunol.*, 1992; 149: 1744-1750). Además, otras situaciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias/enfermedades producidas por inmunocomplejos, están también estrechamente asociadas con la activación del complemento (V.M. Holers, *ibid.*, B.P. Morgan. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1994; 24: 219-228), e incluyen daño térmico, asma grave, choque anafiláctico, inflamación intestinal, urticaria, angioedema, vasculitis, esclerosis múltiple, miastenia grave, glomerulonefritis membranoproliferativa y síndrome de Sjögren.

45 Compendio de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo que es un Fab, (Fab')₂, Fv o Fv monocatenario, que

(i) se une al mismo epítipo sobre factor D humano que el anticuerpo monoclonal 166-32 producido por el hibridoma depositado en la American Type Culture Collection con el número de Registro HB-12476, y

50 (ii) inhibe la activación del complemento de la ruta alternativa en una relación molar de anticuerpo a factor D de 1,5:1.

Se generó un anticuerpo monoclonal que se unió al factor D y que bloqueó su capacidad para activar el complemento, y se designó 166-32. El hibridoma que produce este anticuerpo se depositó en la *American Type Culture Collection*, 10801 *University Blvd.*, Manassas, VA 20110-2209, con el Número de Registro HB-12476008]

Tal anticuerpo no se ha sido descrito en la técnica anterior. Niemann et al., Journal of Immunology 132 (2) (1984), 809-815, describen un anticuerpo monoclonal FD10-1 contra el factor D completo que, sin embargo, no se une al mismo epítipo que el anticuerpo de la presente invención. Pascual et al., Journal of Immunological Methods 127 (1) (1990), 263-269 describe un anticuerpo monoclonal 72-96-25 que inhibía la lisis de eritrocitos de conejo en una relación de 40:1 (anticuerpo:factor D). Este anticuerpo se une a un epítipo sobre factor D que es diferente del epítipo reconocido por el anticuerpo de la presente invención.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la unión de anticuerpos monoclonales (Mab) (del inglés, "*Monoclonal antibodies*") anti-Factor D al factor D humano purificado, en un ensayo ELISA. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb 166-11. La línea marcada con triángulos rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con rombos rellenos representa el MAb 166-188. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-222. El eje Y representa la reactividad de los MAb con el factor D, expresada en forma de la densidad óptica (OD) a 450 nm y el eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 2 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa (AP) (del inglés, "*Alternative Pathway*") de glóbulos rojos (RBC) (del inglés, "*Red Blood Cells*") de conejo no sensibilizado, por acción del MAb 166-32 en presencia de suero humano al 10%. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo, que es específico para la glicoproteína gp120 de la envoltura del HIV. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis, según se describe más adelante en el texto. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 3 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa (AP) de glóbulos rojos (RBC) de conejo no sensibilizado, por acción del MAb 166-32 en presencia de suero humano al 90%. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo, que es específico de la glicoproteína gp120 de la envoltura del HIV. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis, según se describe más adelante en el texto. El eje X representa la concentración de los MAb.

La Fig. 4 muestra que el MAb 166-32 no inhibe la hemólisis por la ruta clásica (CP) (del inglés, "*Classical Pathway*") de los RBC de pollo sensibilizados, mientras que el MAb 137-76 anti-C5 humana, de control positivo, sí la inhibe. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb 137-76. La línea marcada con rombos rellenos y con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32 y el MAb G3-519 de control negativo, respectivamente. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 5 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa (AP), por acción del MAb 166-32. La hemólisis aumentó añadiendo diferentes concentraciones de factor D humano purificado, a suero humano agotado de su factor D mediante cromatografía de afinidad usando MAb 166-222 anti-factor D. Los ensayos se realizaron en presencia o ausencia de los MAb en estudio en concentración de 0,3 µg/ml. La línea marcada con cuadrados rellenos representa la no adición de anticuerpo. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con triángulos rellenos representa el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de factor D.

La Fig. 6 muestra la inhibición de la lisis de células EAC3b, dependiente de factor-D, por acción del MAb 166-32. La convertasa de C3 de la ruta alternativa se ensambló sobre células EAC3b mediante incubación con factor B, factor P y factor D. Se añadieron diferentes concentraciones de MAb 166-32 al tampón de incubación para inhibir la actividad del factor D. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb G3-519. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 7 muestra la inhibición de la producción de C3a en zimosán, por acción del MAb 166-32. El zimosán activó la ruta alternativa del complemento en presencia de suero humano. La producción de C3a se midió usando un kit para ensayo ELISA. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo. El eje Y representa el % de inhibición de la producción de C3a. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 8 muestra la inhibición de la producción de sC5b-9 en zimosán, por acción del MAb 166-32. El zimosán activó la ruta alternativa del complemento en presencia de suero humano. La producción de sC5b-9 se midió usando un kit para ensayo ELISA. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo. El eje Y representa el % de inhibición de la producción de sC5b-9. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 9 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa, de los RBC de conejo no sensibilizado, por acción del MAb 166-32 y de su Fab. La línea marcada con círculos rellenos representa el MAb 166-32 (IgG total). La línea marcada con cuadrados rellenos representa el Fab del MAb 166-32. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de los mAb.

La Fig. 10 muestra el efecto inhibitor del MAb 166-32 sobre el factor D de sueros procedentes de diferentes especies animales, en la hemólisis por la ruta alternativa de los RBC de conejo no sensibilizado. La línea marcada con cuadrados rellenos representa suero humano. La línea marcada con círculos rellenos representa suero de chimpancé. La línea marcada con triángulos rellenos representa suero de mono rhesus. La línea marcada con triángulos rellenos e invertidos representa suero de babuino. La línea marcada con rombos rellenos representa el suero de mono cynomolgus. La línea marcada con círculos vacíos representa suero de oveja. La línea marcada con triángulos vacíos representa suero canino. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración del MAb 166-32.

La Fig. 11 muestra la reactividad del MAb 166-32 con diferentes mutantes e híbridos del factor D ("FD") expresados en Baculovirus, en un ensayo ELISA. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el factor D humano, FD/Hu. La línea marcada con círculos rellenos representa el factor D de cerdo (del inglés, "Pig"), FD/Pig. La línea marcada con triángulos rellenos representa FD/Pighu. La línea marcada con triángulos rellenos e invertidos representa la proteína híbrida FD/Hupig. La línea marcada con rombos rellenos representa la proteína mutante FD/VDA. La línea marcada con círculos vacíos representa la proteína mutante FD/L. La línea marcada con triángulos vacíos representa la proteína mutante FD/RH. La línea marcada con rombos vacíos representa el blanco, sin antígeno de recubrimiento. Las proteínas recombinantes se describen más adelante en el texto.

La Fig. 12 muestra la representación esquemática de los plásmidos vectores de expresión del Fab 166-32 quimérico: (A) pSV2dhfrFd y (B) pSV2neok. Las casillas continuas representan los exones que codifican el Fd o el gen de κ . Los segmentos sombreados representan los elementos promotor y estimulador de la transcripción (E-P) derivados de HCMV, según se indica más adelante. Las casillas vacías son los genes de la dihidrofolato-reductasa (dhfr) y de neo, según aparecen indicados. El plásmido pSV2 consiste en segmentos de DNA procedentes de diversas fuentes: El DNA de pBR322 (línea fina) contiene el origen de replicación de DNA procedente de pBR322 (pBR ori) y el gen de resistencia a ampicilina (Amp), provocada por lactamasa; el DNA de SV40, representado por un sombreado más ancho y marcado, contiene el origen de replicación del DNA de SV40 (SV40 ori), un promotor temprano (en 5' con respecto a los genes dhfr y neo) y una señal de poliadenilación (en 3' con respecto a los genes dhfr y neo). La señal de poliadenilación (pA) derivada de SV40 está también situada en el extremo 3' del gen de Fd.

La Fig. 13 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa (AP), de los RBC de conejos no sensibilizados. La línea marcada con cuadrados rellenos representa el MAb 166-32 murino. La línea marcada con círculos rellenos representa un MAb 166-32 quimérico. La línea marcada con triángulos rellenos representa el anticuerpo G3-519 de control negativo, emparejado por isotipo. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de los anticuerpos.

La Fig. 14 muestra la inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa (AP), de los RBC de conejos no sensibilizados. La línea marcada con cuadrados rellenos representa una 166-32 IgG quimérica. La línea marcada con círculos rellenos representa cFab/9aa. La línea marcada con triángulos rellenos representa cFab. El eje Y representa el % de inhibición de la hemólisis. El eje X representa la concentración de proteína de la IgG y del Fab.

La Fig. 15 muestra los efectos del tratamiento con MAb 166-32 anti-factor D sobre las funciones hemodinámicas de corazones aislados de conejo, perfundidos con plasma humano. La presión telediastólica del ventrículo izquierdo (LVEDP) (del inglés, "*Left Ventricular End-Diastolic Pressure*") está representada con círculos rellenos (en el caso del MAb 166-32) y con cuadrados rellenos (en el caso del MAb G3-519). La presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) (del inglés, "*Left Ventricular Developed Pressure*") está representada con círculos vacíos (en el caso del MAb 166-32) y con cuadrados vacíos (en el caso del MAb G3-519). MAb G3-519 es el control irrelevante, emparejado por isotipo.

La Fig. 16 es una representación típica de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) por acción de los dos grupos de anticuerpos, en un estudio realizado en corazón aislado de conejo. El panel superior representa un corazón tratado con el anticuerpo de control negativo, MAb G3-519, y el panel inferior representa un corazón tratado con el MAb 166-32. El corazón tratado con MAb G3-519 no fue capaz de mantener la LVDP después de la estimulación inmunológica con plasma humano al 4%, mientras que el corazón tratado con MAb 166-32 mantuvo casi la LVDP referencia después de 60 minutos de perfusión con plasma humano al 4%.

La Fig. 17 muestra la concentración de Bb en efluentes linfáticos, en puntos de tiempo seleccionados, en corazones aislados de conejo, perfundidos con plasma humano al 4%. Las muestras procedentes de corazones tratados con MAb 166-32 (círculos vacíos) contuvieron significativamente menos Bb que los corazones tratados con MAb G3-519 (cuadrados rellenos), $p < 0,05$.

La Fig. 18 muestra la actividad hemolítica de la ruta alternativa de muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

La Fig. 19 muestra la concentración de C3a en muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

La Fig. 20 muestra la concentración de sC5b-9 en muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos, de circuitos

extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

La Fig. 21 muestra la concentración de Bb en muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

5 La Fig. 22 muestra la concentración de C4d en muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

La Fig. 23 muestra el nivel de expresión de CD11b sobre la superficie de neutrófilos obtenidos a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos). El nivel de expresión de CD11b está representado por la intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida en análisis inmunocitofluorométricos.

10 La Fig. 24 muestra el nivel de expresión de CD62P sobre la superficie de plaquetas obtenidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos). El nivel de expresión de CD62P está representado por la intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida en análisis inmunocitofluorométricos.

15 La Fig. 25 muestra la concentración de la mieloperoxidasa específica de neutrófilos (MPO) en muestras de plasma recogidas a diferentes tiempos de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 (cuadrados rellenos) o con MAb G3-519 (círculos rellenos).

Descripción del listado de secuencias

El SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos del factor D humano.

El SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del factor D humano.

20 El SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de nucleótidos del factor D de cerdo.

El SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos del factor D de cerdo.

El SEQ ID NO: 5 es el cebador usado para clonar el gen de V_k del MAb 166-32.

El SEQ ID NO: 6 se usó como adaptador hibridado para clonar el gen de V_k del MAb 166-32, según se describe más adelante, y como cebador.

25 El SEQ ID NO: 7 se usó también como adaptador hibridado para clonar el gen de V_k del MAb 166-32, según se describe más adelante.

El SEQ ID NO: 8 se usó como cebador 3' para clonar el gen de V_H del MAb 166-32, según se describe más adelante.

El SEQ ID NO: 9 fue un cebador usado para clonar el gen de V_H del MAb 166-32.

30 El SEQ ID NO: 10 se usó como cebador para clonar se usó para clonar el gen de V_H de MAb 166-32.

El SEQ ID NO: 11 fue el cebador 5' para la PCR del gen de Fd del MAb 166-32.

El SEQ ID NO: 12 fue el cebador 3' para la PCR del gen de Fd del MAb 166-32.

El SEQ ID NO: 13 fue el cebador 5' para la PCR del gen de Fd del MAb 166-32.

El SEQ ID NO: 14 fue el cebador 3' para la PCR del gen de Fd del MAb 166-32.

35 El SEQ ID NO: 15 es la secuencia correspondiente a los aminoácidos adicionales añadidos al Fd para obtener un Fab recombinante.

Elaboración y uso de la invención

A. Generación de anticuerpos monoclonales (MAb) dirigidos contra el factor D humano

40 Los Mab anti-factor D se pueden generar inmunizando roedores (p. ej., ratones, ratas, hámsters y cobayas) o con factor D natural purificado a partir de plasma u orina humano, o con factor D recombinante o sus fragmentos, expresados por sistemas eucariotas o procariotas. Para la inmunización se pueden usar otros animales, p. ej., primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas, y ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (del inglés, "Severe Combined Immunodeficiency", trasplantados con linfocitos B humanos. Se pueden generar hibridomas mediante procedimientos convencionales, fusionando linfocitos B procedentes de los animales inmunizados, con células de mieloma (p. ej., Sp2/0 y NS0), según se describe en G. Köhler y C. Milstein (*Nature*, 1975; 256: 495-497). Además, se pueden generar anticuerpos anti-factor D realizando

45

escrutinios de bibliotecas de Fv o Fab monocatenarios recombinantes, procedentes de linfocitos B humanos, en sistemas de presentación en fagos. La especificidad de los Mab dirigidos contra el factor D humano se puede ensayar mediante el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) (del inglés, "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*"), inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas. La actividad inhibidora de los anticuerpos sobre la activación del complemento se puede evaluar por medio de ensayos hemolíticos, usando glóbulos rojos (RBC) de conejos o cobayas no sensibilizados en el caso de la ruta alternativa, y usando RBC de pollos y ovejas sensibilizados en el caso de la ruta clásica. Los hibridomas de los pocillos positivos se clonan mediante el método de la dilución límite. Los anticuerpos se purifican para la caracterización de su especificidad por el factor D humano, por medio de los ensayos anteriormente descritos.

Si se usasen para tratar enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias en seres humanos, los anticuerpos anti-factor D se usarían preferiblemente en forma de anticuerpos quiméricos, desinmunizados, humanizados o humanos. Esos anticuerpos son capaces de reducir la inmunogenicidad y de esta manera evitar la respuesta de anticuerpos anti-ratón procedentes de seres humanos (HAMA) (del inglés, "*Human Anti-Mouse Antibody*"). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2 u otra IgG o IgM mutada genéticamente, que no aumente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (S.M. Canfield y S.L. Morrison, *J. Exp. Med.*, 1991; 173: 1483-1491) ni la citolisis mediada por el complemento (Y. Xu y col., *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 3468-3474; V.L. Pulito y col., *J. Immunol.*, 1996; 156: 2840-2850).

Los anticuerpos quiméricos se producen mediante procedimientos recombinantes muy conocidos en la técnica, y poseen una región variable de origen animal y una región constante de origen humano. Los anticuerpos humanizados poseen una mayor cantidad de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, sólo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que son responsables de la unión a antígeno y de la especificidad derivan de animales y tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde al anticuerpo animal, y sustancialmente el resto de las porciones de la molécula (excepto, en algunos casos, pequeñas porciones de las regiones estructurales incluidas en la región variable) derivan de seres humanos y corresponden en secuencia de aminoácidos a un anticuerpo humano. Véanse, L. Riechmann y col., *Nature*, 1988; 332: 323-327; G. Winter, Patente de EE. UU. núm. 5.225.539; C. Queen y col., Patente de EE. UU. núm. 5.530.101.

Los anticuerpos desinmunizados son anticuerpos en los que se han eliminado los epítopos para células T y B, según se describe en la solicitud de Patente internacional PCT/GB98/01473. Dichos anticuerpos carecen de inmunogenicidad o tienen una inmunogenicidad reducida cuando se aplican *in vivo*.

Los anticuerpos humanos se pueden preparar de diferentes modos, que incluyen el uso de genotecas de expresión de inmunoglobulinas humanas (*Stratagene Corp.*, La Jolla, California) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fab o F(ab')₂), y el uso de estos fragmentos para construir anticuerpos humanos completos, utilizando técnicas similares a las usadas para construir anticuerpos quiméricos. También se pueden producir anticuerpos humanos en ratones transgénicos que portan un genoma de inmunoglobulinas humanas. Esos ratones se encuentran disponibles procedentes de *Abgenix, Inc.*, Fremont, California, y de *Medarex, Inc.*, Annandale, New Jersey.

También se pueden crear moléculas de unión a péptidos monocatenarios en las que las regiones Fv de cadena ligera y pesada están conectadas. Se describen anticuerpos monocatenarios ("ScFv") (del inglés, "*Single chain Fv*") y el método de su construcción en la Patente de EE. UU. núm. 4.946.778. Como alternativa, se pueden construir y expresar Fab mediante medios similares (M.J. Evans y col., *J. Immunol. Meth.*, 1995; 184: 123-138). Todos los anticuerpos total o parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los Mab totalmente murinos, y los fragmentos y los anticuerpos monocatenarios son también menos inmunogénicos. Por lo tanto, todos estos tipos de anticuerpos tiene menos probabilidad de provocar una inmunorrespuesta o una respuesta alérgica. Por consiguiente, son más adecuados para la administración *in vivo* en seres humanos que los anticuerpos totalmente de procedencia animal, especialmente cuando es necesaria una administración repetida o a largo plazo. Además, el menor tamaño del fragmento de anticuerpo puede ayudar a mejorar su biodisponibilidad a los tejidos, lo que puede ser crítico para una mejor acumulación de la dosis en las indicaciones para enfermedades agudas.

Basándose en las estructuras moleculares de las regiones variables de los anticuerpos anti-factor D, se podría usar modelado molecular y diseño molecular racional para generar y escrutar moléculas pequeñas que imitan las estructuras moleculares de la región de unión de los anticuerpos e inhiben las actividades del factor D. Estas moléculas pequeñas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos. Las moléculas imitadoras se pueden usar como inhibidores de la activación del complemento en indicaciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Alternativamente, se podrían usar procedimientos de escrutinio a gran escala usados comúnmente en la práctica para aislar moléculas pequeñas adecuadas de bibliotecas de compuestos combinatorios. En una de las realizaciones de la invención, un Fab quimérico, que posee regiones variables de origen animal (de ratón) y regiones constantes de origen humano, se usa con fines terapéuticos, debido a que tiene un tamaño menor que una inmunoglobulina completa y a que puede proporcionar una mejor penetración en los tejidos.

B. Aplicaciones de las moléculas anti-factor D

Los anticuerpos y fragmentos anti-factor D con capacidad de unión, de esta invención, se pueden administrar a pacientes en una formulación farmacéutica adecuada, a través de diversas vías, que incluyen, pero que no se limitan a, infusión intravenosa, inyección intravenosa en bolo, y las vías intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intrarraquídea, intracraneal y oral. Estos tipos de administración les permite unirse a factor D endógeno y de esta manera inhibir la generación de las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a, y de C5b-9.

La dosificación estimada preferida de esos anticuerpos y moléculas está entre 10 µg/ml y 500 µg/ml de suero. La dosificación real se puede determinar en ensayos clínicos siguiendo la metodología convencional para determinar dosificaciones óptimas, es decir, administrando distintas dosificaciones y determinando cuál es la más efectiva.

Los anticuerpos anti-factor D son capaces de actuar para inhibir la activación del complemento *in vivo* y/o la ruta alternativa del complemento y las manifestaciones inflamatorias que la acompañan, tales como el reclutamiento y la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células cebadas, edema y daño tisular. Estos inhibidores se pueden usar para tratar enfermedades o situaciones que están mediadas por una activación excesiva o incontrolada del sistema del complemento. Estas enfermedades o situaciones incluyen, pero no se limitan a: (1) daño tisular debido a la isquemia-reperusión posterior a un infarto agudo de miocardio, aneurisma, ictus apoplético, choque hemorrágico, daño por aplastamiento, fracaso multiorgánico, choque hipovolémico e isquemia intestinal; (2) trastornos inflamatorios, por ejemplo, quemaduras, endotoxemia y choque septicémico, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto, circulación extracorpórea cardiopulmonar, hemodiálisis; choque anafiláctico, asma grave, angioedema, enfermedad de Crohn, anemia de células falciformes, glomerulonefritis postestreptocócica y pancreatitis; (3) rechazo de trasplantes, p. ej., rechazo hiperagudo de xenotrasplantes; y (4) reacciones adversas frente a fármacos, p. ej. alergia medicamentosa, síndrome de fuga vascular inducido por IL-2 y alergia a medios de contraste radiográfico. Los trastornos autoinmunitarios que incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple, se pueden tratar también con los inhibidores de la invención.

C. Modelos animales de la eficacia terapéutica de inhibidores del factor D

La actividad terapéutica de inhibidores del factor D en las diferentes indicaciones patológicas anteriormente descritas, se puede confirmar usando modelos animales disponibles de diversas manifestaciones inflamatorias y autoinmunitarias. Los ensayos *in vitro* que se describen más adelante en los ejemplos son adecuados para establecer su eficacia.

Los modelos animales aplicables a diversas enfermedades clínicas relacionadas con el complemento en seres humanos, se pueden usar también para confirmar la eficacia *in vivo* de inhibidores del factor D. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, daño miocárdico producido por isquemia/reperusión (H.F. Weisman y col., *Science*, 1990; 249: 146-151); infarto de miocardio (J.W. Homeister y col., *J. Immunol.* 1993; 150: 1055-1064), lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (S.K. Datta. *Meth. Enzymol.*, 1988; 162: 385-442; D.J. Salvant y A.V. Cybulsky, *Meth. Enzymol.*, 1988; 162: 421-461), artritis reumatoide (Y. Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92: 8955-8959), síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto (R. Rabinovici y col., *J. Immunol.*, 1992; 149: 1744-1750), rechazo hiperagudo en trasplante de órganos (T.J. Kroshus y col., *Transplantation*, 1995; 60: 1194-1202), daños por quemaduras (M.S. Mulligan y col., *J. Immunol.*, 1992; 148: 1479-1485) y circulación extracorpórea cardiopulmonar (C.S. Rinder y col., *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1564-1572).

La ejemplificación de cómo efectuar y usar la invención, y la verificación de su utilidad, se muestran a continuación.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de los MAb anti-factor D

A ratones A/J machos (Harlan, Houston, TX), de 8 - 12 semanas de edad, se les inyectaron por vía subcutánea 25 µg of factor D purificado a partir de suero humano (*Advanced Research Technologies*, San Diego, CA) en adyuvante completo de Freund (*Difco Laboratories*, Detroit, Michigan) en 200 µl de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (del inglés, "*Phosphate Buffered Saline*"), pH 7.4. La preparación de factor D se determinó que era pura en >95% mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). El factor D se sometió a ensayo y se encontró que era biológicamente activo en producir hemólisis, como se describe más adelante. A intervalos de dos semanas, los ratones recibieron dos veces inyecciones subcutáneas de 25 µg de factor D humano en adyuvante incompleto de Freund. Luego, dos semanas más tarde y tres días antes de su sacrificio, los ratones recibieron de nuevo inyecciones intraperitoneales de 25 µg del mismo antígeno en PBS. Para cada una de las fusiones, se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo de un ratón inmunizado y se usaron para la fusión con células Sp2/0 de mieloma. Se fusionaron 5×10^5 células Sp2/0 y 5×10^8 esplenocitos en un medio que contenía polietilenglicol al 50% (MW 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5% (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO). La concentración de las células se ajustó después a $1,5 \times 10^5$ esplenocitos por cada 200 µl de la suspensión, en medio Iscove (Gibco, *Grand Island*, N.Y.), complementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina en concentración de 100 unidades/ml, estreptomina en concentración de 100 µg/ml, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM. Se añadieron 200 µl de la suspensión celular a cada uno de los pocillos de aproximadamente veinte placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de

aproximadamente 10 días, se retiraron los sobrenadantes de los cultivos para someterlos a escrutinio con respecto a su reactividad con factor D purificado, en un ensayo ELISA.

Los pocillos de placas de microensayo Immulon 2 (*Dynatech Laboratories*, Chantilly, VA) se revistieron añadiendo 50 μ l del factor humano purificado, en concentración de 50 ng/ml, durante toda la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de factor D utilizada para el revestimiento permitió la selección de anticuerpos de alta afinidad. Después de que la disolución de revestimiento se hubo retirado sacudiendo la placa, a cada pocillo se añadieron 200 μ l de BLOTTO (leche en polvo desnatada) en PBS, durante una hora, para bloquear los sitios inespecíficos. Una hora más tarde, los pocillos se lavaron con un tampón de PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%). Se recogieron 50 μ l de los sobrenadantes de los cultivos de cada uno de los pocillos usados para la fusión, se mezclaron con 50 μ l de BLOTTO y a continuación se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Los anticuerpos murinos unidos se detectaron luego mediante reacción con una IgG anti-ratón, procedente de cabra, (específica para Fc), conjugada con peroxidasa de rábano rústicano (HRP) (del inglés, "*Horseradish Peroxidase*") (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*, West Grove, PA), y se diluyeron en una proporción 1:2.000 en BLOTTO. La disolución del sustrato de la peroxidasa, que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina al 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) y peróxido de hidrógeno al 0,0003% (Sigma), se añadió a los pocillos para obtener el desarrollo de color durante 30 minutos. Esta reacción se finalizó mediante adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2 M a cada pocillo. La lectura de la OD a 450 nm de la mezcla de reacción se realizó con un aparato de lectura *BioTek ELISA Reader* (*BioTek Instruments*, Winooski, VM).

Los sobrenadantes de los cultivos de los pocillos positivos se sometieron luego a dos ensayos: i) inhibición de la hemólisis por la ruta alternativa, de RBC de conejo no sensibilizado, por acción de suero humano previamente titulado, mediante el método que se describe más adelante; y ii) inhibición de la formación de C3a por zimosán tratado con suero humano, según se describe más adelante. Las células de los pocillos positivos se clonaron mediante el método de dilución límite. Los MAb se ensayaron de nuevo con respecto a su reactividad con el factor D en el ensayo ELISA. Los hibridomas seleccionados se hicieron crecer en matraces de agitación y el sobrenadante de los cultivos agotados se recogió para la purificación de los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad en presencia de proteína A. Se determinaron cuatro MAb fuertemente reactivos con el factor D humano en el ensayo ELISA. Estos MAb se designaron 166-11, 166-32, 166-188 y 166-222 (Fig. 1). De ellos, el MAb 166-32 (IgG1) inhibió fuertemente la hemólisis por la ruta alternativa de los RBC de conejo no sensibilizado, como se describe más adelante.

Ejemplo 2: Determinación de las constantes cinéticas de los MAb anti-factor D mediante el método de resonancia de plasmones en superficie

Las constantes cinéticas de la unión de los MAb 166-11, 166-32, 166-188 y 166-22 al factor D humano se determinaron mediante medidas basadas en la resonancia de plasmones en superficie usando el instrumento BIAcore (*Pharmacia Biosensor AB*, Uppsala, Suecia). Todas las medidas de la unión se realizaron en disolución salina tamponada con (HBS) (del inglés, "*HEPES-Buffered Saline*") (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tensioactivo P20 al 0,005%) a 25°C. Para medir las constantes de la velocidad de unión del factor D a los MAb, una IgG (H+L) anti-ratón, procedente de conejo, se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 a través de un acoplamiento con amina usando N-hidroxisuccinimida y N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)carbo-dimida. Cada uno de los MAb individuales se capturó luego sobre el chip sensor revestido antes de la inyección de factor D a diferentes concentraciones. Para medir las constantes de la velocidad de asociación ($k_{\text{asociación}}$), se realizaron cinco diluciones del factor D (2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM y 20 nM) basadas en la concentración indicada por el fabricante, y se inyectaron en la cámara de flujo a una velocidad de flujo de 5 μ l/min. Para medir las constantes de la velocidad de disociación ($k_{\text{disociación}}$), se inyectó factor D 100 nM en la cámara de flujo a la velocidad de flujo de 5 μ l/min. Los datos, en forma de sensorgramas, se analizaron usando los programas de ajuste de datos implementados en el sistema BIAcore. Ya que el MAb 166-32 tiene una $k_{\text{asociación}}$ muy rápida, que va más allá del límite de fiabilidad del formato analítico debido a la limitación del efecto del transporte de masa, se usó también un formato de unión adicional para medir sus constantes cinéticas de velocidad. El factor D se inmovilizó sobre el chip sensor a través de un acoplamiento con amina según se ha descrito en lo que antecede, mientras que el MAb 166-32 de las diferentes diluciones (5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM y 25 nM en el caso de la medida de la $k_{\text{asociación}}$, y 200 nM en el caso de la medida de la $k_{\text{disociación}}$) se hizo fluir hacia el chip sensor a la velocidad de flujo de 5 μ l/min. Los datos, presentados en forma de sensorgramas, se analizaron según se ha descrito en lo que antecede. Las constantes cinéticas de la unión del factor D a los MAb sobre BIAcore se muestra en la Tabla 1 que viene a continuación. Los MAb 166-32 y 166-222 presentan una afinidad muy alta por el factor D, con una constante de disociación en el equilibrio (K_D) menor que 0,1 nM.

Tabla 1: Constantes cinéticas de la unión del factor D a los MAb medidas en el BIAcore

MAB	$k_{\text{asociación}}(\times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_{\text{disociación}}(\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$K_D(\times 10^{-10} \text{ M})^c$
166-32 ^a	>10	1,1	<1
166-32 ^b	4,6	0,76	1,6
166-188 ^a	8,75	2,1	2,4
166-11 ^a	8,0	1,0	1,24
166-222 ^a	>10	0,8	<1

^a El factor D se usó como analito que se hizo fluir sobre el chip sensor revestido con un MAb anti-factor D capturado por una IgG anti-ratón, procedente de conejo, durante la determinación.
^b El MAb 166-32 se usó como analito y el factor D formó enlaces cruzados con el chip sensor a través del método de acoplamiento con amina.
^c K_D , constante de disociación en el equilibrio = $k_{\text{disociación}} / k_{\text{asociación}}$

Ejemplo 3: Inhibición de la hemólisis activada por el complemento

Para estudiar la actividad funcional de los MAb anti-factor D en la inhibición de la activación del complemento *in vitro*, se usaron dos ensayos hemolíticos.

5 En el caso de la ruta alternativa, RBC de conejo no sensibilizado se lavaron tres veces con disolución salina tamponada con gelatina/veronal (GVB/Mg-EGTA) que contenía MgCl₂ 2 mM y EGTA 1,6 mM. Se usó EGTA en concentración 10 mM para inhibir la ruta clásica (K. Whaley y col., en A.W. Dodds (compilador), *Complement: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 1997, págs. 19-47*). Las células lavadas se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad de $1,7 \times 10^8$ células/ml. En cada uno de los pocillos de una placa de microensayo de 96 pocillos de fondo redondo, 50 μ l de suero humano normal (20%) se mezclaron con 50 μ l de GVB/Mg-EGTA o con un MAb en estudio diluido de manera seriada, luego se añadieron 30 μ l de la suspensión de RBC lavados de conejo a los pocillos que contenían las mezclas. Se mezclaron 50 μ l de suero humano normal (20%) con 80 μ l de GVB/Mg-EGTA para obtener el fondo de color del suero. Como control negativo, se usó un Mab anti-gp120 de HIV-1, emparejado por isotipo, el G3-519. La mezcla final se incubó a 37°C durante 30 minutos. La placa se agitó después en un agitador para placas de microensayo durante 15 segundos. A continuación la placa se centrifugó a 300 x g durante 3 minutos. Se recogieron los sobrenadantes (80 μ l) y se transfirieron a los pocillos de placas de microensayo de 96 pocillos de fondo plano para obtener la medida de la OD a 405 nm. El tanto por ciento de inhibición de la hemólisis se define como $100 \times [(OD \text{ sin MAb} - OD \text{ del fondo de color del suero}) - (OD \text{ con MAb} - OD \text{ del fondo de color del suero})] / (OD \text{ sin MAb} - OD \text{ del fondo de color del suero})$.

20 La Fig. 2 muestra que el MAb 166-32 inhibe fuertemente, y de una manera dependiente de la dosis, la hemólisis por la ruta alternativa de los RBC de conejo no sensibilizado, en presencia de suero humano al 10%, mientras que el MAb G3-519 irrelevante de control, emparejado por isotipo, no la inhibe. El MAb G3-519 es específico para la glicoproteína gp120 de la envoltura de HIV.

25 En los ensayos realizados para determinar la actividad inhibidora del MAb166-32 en suero humano al 90%, un suero humano congelado se descongeló y se pretrató con EGTA hasta alcanzar una concentración final 10 mM. Diez microlitros del MAb 166-32 o del MAb G3-519 diluidos de manera seriada, se añadieron a 90 μ l suero humano tratado con EGTA, en pocillos duplicados de una placa de microensayo de 96 pocillos, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A cada uno de los pocillos se añadieron 30 μ l de los RBC de conejo lavados. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. La placa se agitó sobre un agitador para placas, durante 15 segundos y luego se centrifugó a 300 x g durante 3 minutos. Los sobrenadantes (80 μ l) se recogieron y se transfirieron a pocillos de una placa de microensayo de 96 pocillos de fondo plano para medir la OD a 405 nm. Cada placa contenía dos pocillos que contenían 100 μ l de suero humano al 90% y 30 μ l del tampón considerado como fondo de color del suero, y también dos pocillos que contenían los RBC lisados con 100 μ l de suero humano al 90%, en ausencia de anticuerpo monoclonal, para representar la lisis completa. La Fig. 3 muestra que el MAb 166-32 inhibe fuertemente y de una manera dependiente de la dosis, la hemólisis por la ruta alternativa de los RBC de conejo no sensibilizado, incluso en presencia de suero humano al 90%.

40 En el caso de la ruta clásica, RBC procedentes de pollo (5×10^7 células/ml) en disolución salina tamponada con gelatina/veronal (GVB⁺⁺) que contenía MgCl₂ 0,5 mM y CaCl₂ 0,15 mM, fueron sensibilizados con inmunoglobulinas anti-RBC de pollo, procedentes de conejo, purificadas, y en una concentración de 8 μ g/ml (*Inter-Cell Technologies, Hopewell, NJ*) durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron luego con GVB⁺⁺. La concentración final de suero humano usada fue del 2%.

La Fig. 4 muestra los datos de que el MAb 166-32 y el MAb G3-519 irrelevante de control no inhiben la hemólisis por la ruta clásica de los RBC de pollo sensibilizado, mientras que el MAb 137-76 anti-C5 humana, de control positivo sí

la inhibe. Los datos de las Figs. 2, 3 y 4 indican que el MAb 166-32 es específico de la inhibición de la ruta alternativa de la activación del complemento.

Ejemplo 4: Especificidad del MAb 166-32 para factor D

5 Dos ensayos hemolíticos, según se describen a continuación, se usaron para demostrar la especificidad del MAb 166-32 para el factor D humano.

(1) Inhibición de ensayos hemolíticos dependientes de factor D usando RBC de conejo no sensibilizado

Una muestra de suero humano, en primer lugar se agotó en factor D haciéndola pasar a través de una columna de afinidad empaquetada con el medio *3M Emphaze Biosupport Medium* (Pierce, Rockford, IL) que llevaba acoplado el MAb 166-32 anti-factor D. El suero eluido de la columna se determinó que era inactivo en cuanto a desencadenar una hemólisis por la ruta alternativa debido a que el factor D se había agotado por completo. El procedimiento de este ensayo es similar al que se ha descrito en el Ejemplo 3 en lo que antecede, excepto en que se añadió factor D purificado, de diferentes concentraciones, al suero agotado en factor D, para reconstituir la actividad hemolítica. En estas condiciones, la hemólisis de los RBC de conejo fue dependiente de factor D. Se demostró que la actividad hemolítica reconstituida es linealmente proporcional a la concentración del factor D complementado (de 0,01 µg/ml a 2 µg/ml (Fig. 5)). Los datos de la Fig. 5 también muestran que una concentración de 0,3 µg/ml del MAb 166-32 es capaz de inhibir completamente la hemólisis de los RBC de conejo no sensibilizados, en presencia de factor D complementado en concentración de 0,1 µg/ml, mientras que el MAb G3-519 de control negativo no tiene efecto sobre la hemólisis dependiente de factor D. Estos datos sugieren que el MAb 166-32 es capaz de inhibir de manera efectiva la actividad biológica del factor D humano en un relación molar de 1:2 (de MAb 166-32 con respecto a factor D). Por lo tanto, el MAb 166-32 es un anticuerpo potente, de alta afinidad por el factor D. Este anticuerpo posee el potencial para ser usado en clínica para tratar enfermedades o indicaciones causadas por la activación de la ruta alternativa del complemento.

(2) Inhibición de la formación de la convertasa de C3 de la ruta alternativa en células EAC3b

Las células EAC3b son RBC de oveja revestidos con C3b humana (adquirida del *National Jewish Center of Immunology and Respiratory Medicine*, Denver, CO). En este ensayo, la convertasa de C3 de la ruta alternativa se ensambló en la superficie de las células EAC3b a través de la adición de factor B, factor P (properdina) y factor D. Las células EAC3b (5×10^8) se lavaron luego tres veces en medio DGVB⁺⁺ (disolución salina tamponada con veronal al 50%, pH 7,2, que contenía CaCl₂ 0,075 mM, MgCl₂ 0,25 mM, gelatina al 0,1%, dextrosa al 2,5% (p/v) y azida sódica al 0,01%). Las células lavadas se resuspendieron luego en 1,5 ml de DGVB⁺⁺, factor P (30 µg) y factor B (20 µg). Las concentraciones del factor P y del B se predeterminaron para que estuvieran en exceso. Cincuenta microlitros de la suspensión celular se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de microensayo de 96 pocillos de fondo redondo. A continuación, 50 µl de una mezcla de factor D (1,2 ng/ml) y del MAb 166-32 o del MAb G3-519 diluidos de manera seriada, se añadieron a los pocillos que contenían las células para su incubación durante 15 minutos a 30°C. La concentración del factor D (1,2 ng/ml) se predeterminó para que proporcionara una hemólisis de más del 90% en estas condiciones. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces en medio GVB-EDTA (disolución salina tamponada con gelatina/veronal que contenía EDTA 10 mM). Las células se resuspendieron luego en 30 µl de medio GVB-EDTA. Para iniciar la hemólisis, a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µl de suero de cobaya (Sigma) (diluido en proporción 1:10 en GVB-EDTA). Las mezclas se incubaron después a 37°C durante 30 minutos. La placa de microensayo se centrifugó luego a 300 x g durante 3 minutos. El sobrenadante se recogió para medir la OD a 405 nm.

La Fig. 6 muestra los resultados de los experimentos en los que el MAb 166-32 inhibe la lisis de las células EAC3b, mientras que el MAb G3-519 irrelevante no la inhibe. El MAb 166-32 inhibe al factor D de escindir al factor B, impidiendo por lo tanto la formación de la convertasa de C3 sobre la superficie de las células EAC3b.

45 Ejemplo 5: Inhibición de la generación de C3a por un zimógeno activado por el complemento, por acción del MAb 166-32

Para constatar de nuevo la especificidad funcional del MAb 166-32 para el factor D, se estudió el efecto de ese MAb sobre la activación de complemento por la ruta alternativa sobre zimosán (partículas de levadura activadas). El zimosán A (procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) (1 mg/ml) se lavó tres veces en GVB/Mg-EGTA y luego se resuspendió en el mismo medio a concentración de 1 mg/ml. Veinticinco microlitros del MAb 166-32 o del MAb G3-519 en diferentes concentraciones, se mezclaron con 25 µl de suero humano (diluido en proporción 1:5 en GVB/Mg-EGTA) en un microtubo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. El blanco no contenía anticuerpo sino simplemente medio y suero. Después de la incubación, 50 µl de la suspensión de zimosán lavado se añadieron a cada uno de los tubos para su incubación durante 30 minutos a 37°C. Los microtubos se centrifugaron luego a 2.000 x g durante 5 minutos, los sobrenadantes se recogieron y se mezclaron con un volumen igual de *Specimen Stabilizing Solution* (Quidel, San Diego, CA). Las muestras se congelaron a -25°C hasta el momento de su ensayo. La concentración de C3a y de sC5b-9 en las muestras se midió con kits para ensayo ELISA cuantitativo (Quidel) conforme a los procedimientos proporcionados por el fabricante.

La Fig. 7 muestra que el MAb 166-32 inhibe la generación de C3a por zimosán activado por el complemento,

5 mientras que el MAb G3-519 irrelevante no tiene efecto. Estos datos sugieren que el MAb 166-32 inhibe la formación de la convertasa de C3 por acción del factor D. La inhibición completa del factor D por acción del MAb 166-32 es capaz de bloquear de manera efectiva la formación de la convertasa de C3, como se indica por la incapacidad para generar C3a. Esto dará lugar a la inhibición de la convertasa de C5 en las posteriores etapas de la cascada del complemento, como se evidencia por la inhibición de la formación de sC5b-9 (MAC) (Fig. 8).

Ejemplo 6: Inhibición de la hemólisis activada por el complemento, por acción del Fab del MAb 166-32

10 Con el fin de estudiar si la forma monovalente del MAb 166-32 es tan efectiva en cuanto a inhibir la ruta alternativa del complemento como el MAb 166-32 bivalente de origen, el Fab del MAb 166-32 se preparó mediante digestión con papaína usando un kit comercial de reactivos (Pierce). El Fab se sometió luego a ensayo para determinar su actividad inhibitoria sobre la hemólisis por la ruta alternativa, usando RBC de conejo no sensibilizado, según se ha descrito en los que antecede.

15 La Fig. 9 muestra los datos de los experimentos en los que tanto la IgG completa como el Fab muestran una potencia similar en cuanto a bloquear la activación del complemento por la ruta alternativa, teniendo en cuenta que existen dos sitios de unión por molécula de anticuerpo. Estos resultados sugieren que la forma monovalente del MAb 166-32 es activa y conserva una potencia frente al factor D similar a la de su anticuerpo bivalente de origen. Esta propiedad es verdaderamente importante a la hora de considerar usar el Fab o el Fv monocatenario como productos alternativos. Una de las ventajas de usar estas últimas formas monovalentes es que pueden presentar una mejor penetración en los tejidos debido a su menor tamaño. En vista de que el Fab del MAb 166-32 es activo, es probable que el epítipo de unión presente sobre el factor D y reconocido por el Mab, sea funcionalmente importante.

20 Ejemplo 7: Efectos del MAb 166-32 sobre la hemólisis por la ruta alternativa usando sueros procedentes de diferentes especies animales

25 Con el fin de estudiar la reactividad cruzada del MAb 166-32 con el factor D procedente de diferentes especies animales, se realizaron ensayos hemolíticos por la ruta alternativa usando sueros procedentes de diferentes especies animales. Sueros recién preparados procedentes de diferentes especies animales (seres humanos, mono rhesus, chimpancé, babuino, mono cynomolgus, oveja, perro, ratón, hámster, rata, conejo, cobaya y cerdo) se ensayaron primero para determinar los valores de la CH50, que se definen como la dilución de suero necesaria para conseguir una lisis del 50% de los RBC de conejo no sensibilizado. La actividad inhibitoria del MAb 166-32 sobre la misma actividad hemolítica (CH50) de cada uno de los sueros se ensayó y comparó después.

30 La Fig. 10 muestra que el MAb 166-32 presenta una potente actividad inhibitoria frente a sueros procedentes de seres humanos, mono rhesus, babuino, mono cynomolgus y chimpancé, y una moderada actividad inhibitoria frente a sueros procedentes de oveja y perro. El anticuerpo no inhibe los sueros procedentes de ratón, hámster, rata, conejo, cobaya y cerdo. Estos datos sugieren que el MAb 166-32 se une a un epítipo presente en el factor D, que es compartido por seres humanos, monos rhesus, chimpancés, babuinos, monos cynomolgus, ovejas y perros.

Ejemplo 8: Construcción de mutantes del factor D humano con respecto al mapeo epitópico del MAb 166-32

35 Para distinguir el epítipo de unión presente en el factor D humano, reconocido por el MAb 166-32, en primer lugar se ensayó la reactividad del anticuerpo con el factor D humano en transferencias Western. El MAb 166-32 no reaccionó con factor D humano desnaturizado con SDS (tanto reducido como no reducido), inmovilizado sobre una membrana de celulosa. Este resultado indica que el MAb 166-32 se une a factor D natural pero no a factor D desnaturizado.

40 Ya que el MAb 166-32 no inhibe la actividad hemolítica del factor D de ratón y cerdo, según se describe en el Ejemplo 7, es probable que el MAb 166-32 se una a un sitio presente sobre el factor D humano, que tenga un alto grado de diferencia en cuanto a la secuencia de aminoácidos con respecto a los sitios del factor D de ratón y cerdo. Partiendo de este concepto, se construyeron diversos mutantes e híbridos del factor D reemplazando residuos de aminoácidos del factor D humano por los residuos de aminoácidos correspondientes del factor D de cerdo, para realizar el mapeo del epítipo de unión para el Mab 166-32, según se describe más adelante.

(1) Construcción de mutantes e híbridos del factor D

50 Se obtuvieron segmentos del gen del factor D humano mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando como molde cDNA de adipocitos humanos (*Clontech*, San Francisco, CA) y usando cebadores oligonucleotídicos adecuados. Los fragmentos de DNA amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI y el producto digerido se insertó en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pVL1393 de transferencia en Baculovirus (*Pharmingen*, San Diego, CA) para obtener el pVL1393-factor D/Hu de tipo salvaje. El factor D humano se designa como factor D/Hu. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína madura del factor D humano se muestran en los SEQ ID NOS: 1 y 2 (R.T. White y col., *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 9210-9213; GenBank, número de registro: M84526).

55 El clon pMon24909 de cDNA de factor D cerdo se obtuvo como obsequio de J.L. Miner, de la Universidad de Nebraska (*GenBank*, Número de registro: U29948). Los fragmentos *Bam*HI-*Eco*RI del pMon24909 se clonaron en

pVL1393 para obtener e pVL1393-factor D/*Pig*. El factor D de cerdo se designa como factor D/*Pig*. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína madura del factor D de cerdo se muestran en los SEQ ID NOS: 3 y 4.

5 Se construyeron tres mutantes del factor D humano usando cebadores adecuados y una PCR solapante. Las mutaciones de aminoácidos se diseñaron reemplazando los residuos de aminoácidos de la secuencia en seres humanos por los residuos de aminoácidos correspondientes de la secuencia en cerdo, cuando las secuencias de aminoácidos del factor D humano y del factor D de cerdo se alinean para comparación de la homología. El primer mutante, el factor D/*VDA*, contenía tres mutaciones de aminoácidos: V113E, D116E y A118P. (Este es un método abreviado para designar mutaciones, en el que por ejemplo, V113E significa que la valina situada en el residuo de aminoácido número 113 en el factor D humano, se cambió por ácido glutámico en el factor D de cerdo). El segundo mutante, el factor D/*RH*, contenía dos mutaciones de aminoácidos: R156L y H159Y. El tercer mutante, el factor D/*L*, contenía una única mutación: L168M. Las secuencias de DNA que codifican estos mutantes fueron confirmadas mediante secuenciación de DNA. Después de realizar una digestión con las enzimas adecuadas, los fragmentos de DNA se insertaron en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pVL1393 de transferencia en Baculovirus para obtener pVL1393-factorD/*VDA*, pVL1393-factorD/*RH* y pVL1393-factorD/*L* respectivamente.

20 También se construyeron dos híbridos quiméricos de factor D de seres humanos y cerdo, usando cebadores adecuados y una PCR solapante. El primero de los híbridos, el factor D/*Hupig*, contenía 52 aminoácidos derivados del factor D humano, situados en el extremo N-terminal, y los aminoácidos restantes derivaban del factor D de cerdo. El segundo de los híbridos, el factor D/*Pighu*, contenía 52 aminoácidos derivados del factor D de cerdo, situados en el extremo N-terminal, y los aminoácidos restantes derivaban del factor D humano. Los fragmentos de DNA digeridos con *Bam*HI y *Eco*RI se insertaron en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector pVL1393 de transferencia en Baculovirus, para obtener pVL1393-factorD/*Hupig* y pVL1393-factorD/*Pighu*.

(2) Expresión de mutantes e híbridos del factor D

25 Los procedimientos de transfección de los plásmidos, la generación de Baculovirus recombinantes y la producción de proteínas recombinantes de factor D en células Sf9 de insectos, se realizaron conforme el manual del fabricante (*Baculovirus Expression Vector System*, Pharmingen).

(3) Purificación de mutantes e híbridos de factor D

30 Las proteínas híbridas y mutantes de factor D, procedentes de los sobrenadantes de los cultivos de las células Sf9 infectadas, se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando anticuerpos policlonales anti-factor D humano, procedentes de oveja y purificados (*The Binding Site Limited*, San Diego, CA). Tres mililitros de anticuerpos anti-factor D humano, procedente de oveja (13,2 mg/ml), se equilibraron en un tampón de acoplamiento (borato 0,1 M y Na₂SO₄ 0,75 M, pH 9,0) y se acoplaron con 4 ml de *Ultralink Biosupport Medium* (Pierce) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las bolitas se lavaron primero con dietilamina 50 mM, pH 11,5, para saturar todos los sitios reactivos remanentes, y luego con un tampón que contenía Tris 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 1% y NaN₃ al 0,02%, pH 8,0. El gel se almacenó en este tampón a 4°C.

40 El sobrenadante del cultivo, recogido de 100 ml de cultivo en agitación de células Sf9 infectadas con los diversos mutantes de Baculovirus, se hicieron pasar a través de la columna de afinidad que contenía anticuerpo anti-factor D procedente de oveja, que se había pre-equilibrado con PBS para retirar el tampón de almacenamiento. Las proteínas de factor D unidas se eluyeron con dietilamina 50 mM, pH 11,5. Las fracciones recogidas se neutralizaron inmediatamente hasta pH 7,0 con tampón de Hepes 1 M. Las sales residuales se retiraron mediante cambio del tampón con PBS a través de ultrafiltración en membrana Millipore (valor de exclusión de MW: 3.000) (*Millipore Corp.*, Bedford, MA). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de BCA (Pierce).

(4) Ensayo ELISA de factor D

45 La reactividad del MAb 166-32 con los diversos mutantes e híbridos de factor D se ensayó mediante ELISA. Los diferentes pocillos de placas de microensayo de 96 pocillos se revistieron con las proteínas (factor D/*Hu*, factor D/*Pig*, factor D/*Hupig*, factor D/*Pighu*, factor D/*VDH*, factor D/*RH* y factor D/*L*) mediante adición de 100 µl de cada una de las proteínas en concentración de 0,5 µg/ml en PBS. Después de una incubación toda la noche a temperatura ambiente, los pocillos se trataron con PBSTB (PBST que contenía BSA al 2%) para saturar los sitios de unión remanentes. Los pocillos se lavaron luego con PBST. Cien microlitros del Mab 166-32 diluido de manera seriada (desde 1 µg/ml hasta 0,5 ng/ml) se añadieron a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron luego con PBST. El anticuerpo unido se detectó mediante incubación con IgG (Fc) anti-ratón procedente de cabra, conjugada con HRP y diluida (*Jackson ImmunoResearch*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadió una disolución con el sustrato de la peroxidasa para obtener el desarrollo del color, según se ha descrito en lo que antecede. La OD se midió usando un aparato de lectura para ELISA a 450 nm.

55 La Fig. 11 muestra que el MAb 166-32 reacciona con el factor D/*Hu*, factor D/*Pighu* y factor D/*VDA*, pero no con el factor D/*Pig*, factor D/*Hupig*, factor D/*RH* ni factor D/*L*. Los resultados del ensayo ELISA indican que los residuos de aminoácidos Arg156, His159 y Leu168 del factor D humano son esenciales para la unión del MAb 166-32. Esto está de acuerdo con el hecho de que el MAb 166-32 no se unió al factor D/*Hupig* cuando la porción C-terminal del factor

D humano se reemplazó por la de cerdo. Los residuos de aminoácidos Arg156, His159 y Leu168 se encuentran situados en el denominado "bucle de metioninas" constituido por una unión disulfuro entre Cys154 y Cys170, con un residuo de metionina situado en la posición 169 (J.E. Volanakis y col., En: *The Human Complement System in Health and Disease*, J.E. Volanakis y M.M. Franks, compiladores, Marcel Dekker, 1998, págs. 49-81).
 5 Estructuralmente, el "bucle de metioninas" es miembro de un giro β beta rígido de tipo 1. Se ha encontrado que este bucle está expuesto en la superficie de la molécula del factor D, según los datos obtenidos de estudios de cristalografía por rayos X (S.V.L. Narayana y col., *J. Mol. Biol.*, 1994, 235: 695-708). Sin embargo, la contribución del "bucle de metioninas" a la especificidad por el sustrato y a la catálisis del factor D no se ha estudiado nunca (J.E. Volanakis y col., *Protein Sci.*, 1996; 5: 553-564). Los datos aquí presentados han demostrado por primera vez que el
 10 "bucle de metioninas" desempeña un papel importante en la actividad funcional del factor D. El MAb 166-32 y su Fab, cuando están unidos a esta región sobre el factor D, son capaces de inhibir de manera efectiva la catálisis del factor D.

Ejemplo 9: Clonación de genes de las regiones variables del MAb 166-32 anti-factor D, y construcción y expresión de una IgG 166-32 quimérica y de su Fab

15 Con el fin de reducir la inmunogenicidad del MAb 166-32 para cuando se use en seres humanos, se construyó una forma quimérica del MAb 166-32 reemplazando las regiones constantes de ratón por regiones constantes humanas de IgG1. También se construyeron dos formas de un Fab quimérico de ese anticuerpo, reemplazando las regiones constantes de ratón por sus correspondientes regiones humanas. La clonación de genes de las regiones variables del MAb 166-32, y la construcción y expresión del anticuerpo 166-32 quimérico y de su Fab se describen más
 20 adelante.

(1) Clonación de genes de las regiones variables de MAb anti-factor D

Se aisló RNA total a partir de células de hibridoma que secretan el MAb 166-32 anti-factor D, usando RNazol siguiendo el protocolo del fabricante (*Biotech*, Houston, TX). La primera cadena de cDNA se sintetizó a partir de ese RNA total, usando un oligo dT como cebador. La PCR se realizó usando cebadores 3' derivados de regiones
 25 constantes (C) de inmunoglobulinas y usando conjuntos de cebadores degenerados derivados del péptido conductor o de la primera región estructural de genes V_H o V_K murinos como cebadores 5'. Aunque se detectó DNA amplificado correspondiente a V_H , no se amplificó ningún fragmento de DNA de las longitudes esperadas para V_K . Tanto el gen de V_H como el gen de V_K se clonaron mediante PCR anclada.

La PCR anclada se llevó a cabo de la manera descrita por Chen y Platsucas (*Scand. J. Immunol.*, 1992; 35: 539-549). Para clonar el gen de V_K , se preparó cDNA bicatenario usando el cebador *NotI*-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO: 5). Adaptadores hibridados AD1 (5'-GGAATTCAGCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 6) y AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 7) se ligaron a ambas terminaciones 5' y 3' del cDNA bicatenario. Los adaptadores situados en los extremos 3' se retiraron mediante digestión con *NotI*. El producto digerido se usó como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 como
 30 cebador 5' y con MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTCC-3' SEQ ID NO: 8) como cebador 3'. Fragmentos de DNA de aproximadamente 500 pb se clonaron en pUC19. Se seleccionaron doce clones para análisis posteriores. Se encontró que siete clones contenían la secuencia de la CDR3 específica del mensaje de V en Sp2/0, y presumiblemente esos clones derivaban de los mensajes aberrantes de la cadena ligera κ de la pareja de fusión de la línea celular de hibridoma 166-32. Los oligonucleótidos *NotI*-MAK1 y MAK2 derivaban de la región C_K murina y consistían en 182 pb y 84 pb respectivamente, aguas abajo del primer pb del gen de C_K . Se analizaron tres clones mediante secuenciación de DNA y se obtuvieron secuencias que abarcaban parte de la C_K murina, la V_K completa y el péptido conductor.

Para clonar el gen V_H , se preparó cDNA bicatenario usando el cebador *NotI*-MAG1 primer (5'-CGCGGCCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 9). Los adaptadores hibridados AD1 y AD2 se ligaron a las terminaciones 5' y 3' del cDNA bicatenario. Los adaptadores situados en los extremos 3' se retiraron mediante digestión con *NotI*. El producto digerido se usó como molde en la PCR con el oligonucleótido AD1 y con MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGAAATA-3' SEQ ID NO: 10) como cebadores. Fragmentos de DNA de 500 pb a 600 pb de longitud se clonaron en pUC19. Los oligonucleótidos *NotI*-MAG1 and MAG2 derivaban de la región C_Y 1 murina y consistían en 180 pb y 93 pb, respectivamente, aguas abajo del primer pb del gen de C_Y 1 murino. Se analizaron tres clones mediante secuenciación de DNA, obteniéndose secuencias que abarcaban parte del C_Y 1 murino, la V_H completa y el péptido conductor.

(2) Construcción de vectores de expresión de la IgG 166-32 y el Fab quiméricos

Los genes de V_H y V_K se usaron como moldes en la PCR para añadir la secuencia de Kozak en el extremo 5' y el sitio donador de corte y empalme en el extremo 3'. Después de que las secuencias se hubieron analizado para
 55 confirmar la ausencia de errores en la PCR, los genes de V_H y V_K se insertaron en casetes vectores de expresión que contenían el C_Y 1 y el C_K humanos respectivamente, para obtener pSV2neo V_H -hu C_Y 1 y pSV2neo V_H -hu C_K . Los DNA plasmídicos, purificados en gradiente de CsCl, de los vectores que portaban la cadena ligera y la cadena pesada, se usaron para transfectar células COS mediante electroporación. Pasadas 48 horas, se determinó mediante el ensayo ELISA que el sobrenadante del cultivo contenía aproximadamente 200 ng/ml de la IgG

quimérica. Las células se recogieron y se preparó RNA total. Se sintetizó la primera cadena de cDNA a partir de ese RNA total usando un oligo dT como cebador. Este cDNA se usó como molde en la PCR para generar los fragmentos de DNA de Fd y κ . En el caso del gen de Fd, la PCR se llevó a cabo usando (5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAGT-3' SEQ ID NO: 11) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTTGCCACCTTGG-3' SEQ ID NO: 12). Se confirmó que la secuencia de DNA contenía la V_H completa y el dominio CH1 de la IgG1 humana. Después de la digestión con las enzimas adecuadas, los fragmentos de DNA de Fd se insertaron en los sitios de restricción *Hind*III y *Bam*HI de la casete vector de expresión pSV2dhfr-TUS para obtener pSV2dhfrFd (Fig. 12 A).

En el caso del gen de κ , la PCR se llevó a cabo usando (5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' SEQ ID NO: 13) como cebador 5' y un cebador 3' derivado de C _{κ} (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO: 14). Se confirmó que la secuencia de DNA contenía la región V _{κ} completa y la región C _{κ} humana. Después de una digestión con las enzimas de restricción adecuadas, los fragmentos del DNA de κ se insertaron en los sitios de restricción *Hind*III y *Bam*HI de la casete vector de expresión pSV2neo-TUS para obtener pSV2neok (Fig. 12B). Las expresiones de los genes de Fd y de κ están dirigidas por los elementos promotor y estimulador de la transcripción, derivados de HCMV. Debido a que el gen de Fd no incluye el residuo de aminoácido cisteína que participa en el enlace disulfuro intercatenario, este Fab quimérico recombinante contiene las cadenas ligera y pesada unidas no covalentemente. Este Fab quimérico se designa cFab.

Para obtener un fragmento Fab recombinante con un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada, el gen de Fd anteriormente mencionado se extendió para que incluyera la secuencia codificadora de 9 aminoácidos adicionales (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 15) procedentes de la región bisagra de la IgG1 humana. El segmento de DNA *Bst*EII-*Bam*HI que codifica 30 aminoácidos situados en el extremo 3' del gen de Fd, se reemplazó por segmentos de DNA que codificaban el Fd extendido. La secuencia del Fd extendido con 9 aminoácidos adicionales procedentes de la región bisagra de la IgG1 humana, se confirmó mediante secuenciación de DNA. Este gen del Fd/9aa se insertó en la casete vector de expresión pSV2dhfr-TUS para obtener pSV2dhfrFd/9aa. Este Fab quimérico se designa cFab/9aa.

(3) Expresión de la IgG 166-32 y su Fab quiméricos

Para generar líneas celulares que secretan IgG 166-32 quimérica, células NS0 se transfectaron con los DNA plasmídicos purificados de pSV2neoV_H-huC γ 1 y pSV2neoV-huC _{κ} mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron en presencia de G418 en concentración de 0,7 mg/ml. Las células se hicieron crecer en un matraz de agitación de 250 ml usando un medio que contenía suero.

Para generar las líneas celulares que secretan el Fab 166-32 quimérico, células CHO se transfectaron con los DNA plasmídicos purificados de pSV2dhfrFd (o pSV2dhfrFd/9aa) y pSV2neok mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron en presencia de G418 y metotrexato. Las líneas celulares seleccionadas se amplificaron en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato. Las células se subclonaron mediante dilución límite hasta obtener células individuales. Las líneas celulares subclonadas, de células individuales y altamente productoras, se hicieron crecer luego en cultivos en agitación de 100 ml, usando un medio libre de suero.

(4) Purificación de la IgG 166-32 quimérica

El sobrenadante del cultivo en agitación de 100 ml se cargó sobre una columna PROSEP-A de 10 ml (*Bioprocessing, Inc.*, Princeton, NJ). La columna se lavó con un volumen de PBS igual a 10 veces el volumen del lecho. El anticuerpo unido se eluyó con tampón de citrato 50 mM, pH 3,0. Un volumen igual de Hepes 1 M, pH 8,0, se añadió a la fracción que contenía el anticuerpo purificado para ajustar el pH a 7,0. Las sales residuales se retiraron mediante cambio del tampón con PBS a través de ultrafiltración en membrana Millipore (valor de exclusión de MW: 3.000). La concentración de proteína del anticuerpo purificado se determinó mediante el método de BCA (Pierce).

(5) Purificación del Fab 166-32 quimérico

El Fab 166-32 quimérico se purificó mediante cromatografía de afinidad usando un Mab anti-idiotipo procedente de ratón, dirigido contra MAb 166-32. Ese Mab anti-idiotipo se designa MAb 172-25-3. Se generó inmunizando ratones con MAb 166-32 conjugado con hemocianina de lapa californiana (KLH) (del inglés, "*Keyhole Limpet Hemocyanin*") y realizando un escrutinio con respecto a la unión específica a MAb 166-32, que podría ser competida por el factor D humano.

La matriz de la cromatografía de afinidad se preparó mezclando 25 mg del MAb 172-25-3 con 5 ml de bolitas de azlactona secas (*UltraLink Biosupport Medium*, Pierce) en un tampón de acoplamiento (borato 0,1 M y Na₂SO₄ 0,75 M, pH 9,0) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los sitios reactivos residuales se bloquearon con etanolamina 1 M, pH 9,0, durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Las bolitas se lavaron luego en un tampón que contenía Tris 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 5 mM, Tritón X-100 al 1% y NaN₃ al 0,02% (pH 8,0) y después se almacenaron a 4°C.

Para la purificación, 100 ml de sobrenadante procedente de los cultivos en agitación de células CHO productoras de

cFab o cFab/9aa, se cargaron sobre la columna de afinidad que llevaba acoplado el MAb 172-25-3. La columna se lavó luego profusamente con PBS antes de eluir el Fab unido con dietilamina 50 mM, pH 11,5. Las sales residuales se retiraron mediante cambio del tampón según se ha descrito en lo que antecede. La concentración de proteína del Fab purificado se determinó mediante el método de BCA (Pierce).

5 (6) SDS-PAGE de la IgG 166-32 quimérica, de cFab y cFab/9aa

La IgG 166-32 quimérica, el cFab y el cFab/9aa se analizaron con respecto a su pureza y tamaño molecular mediante SDS-PAGE. Las proteínas se trataron con tampones para muestras, con o sin mercaptoetanol. El desarrollo de las muestras se realizó luego sobre geles polimerizados en molde prefabricado (del inglés, "pre-cast gels") (al 12,5%) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) junto con estándares de peso molecular pre-
10 teñidos (en el intervalo de bajo peso molecular) (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA) usando el PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech.). Los geles se tiñeron luego con una disolución de Azul brillante de Coomassie (BIO-RAD) durante 5 minutos y a continuación de decoloraron en una disolución acosa que contenía metanol al 40% y ácido acético al 10%.

Los resultados de una SDS-PAGE de cFab, cFab/9aa y de IgG quimérica, tratados tanto en condiciones reductoras como no reductoras, mostraron que la IgG quimérica posee una banda proteica de 150 kDa y dos bandas proteicas de cadena pesada (HC) (del inglés, "Heavy Chain") y de cadena ligera (LC) de aproximadamente 50 kDa y 29 kDa, respectivamente. Como era de esperar, el cFab/9aa presentó sólo 1 banda proteica de aproximadamente 40 kDa en condiciones no reductoras, lo que indica que las cadenas ligera y pesada están unidas por un enlace disulfuro intercatenario. Por otra parte, el cFab mostró dos bandas proteicas en condiciones no reductoras, lo que indica que
20 las cadenas ligera y pesada no están unidas por un puente disulfuro intercatenario.

(7) Determinación de las actividades de la IgG 166-32 quimérica, de cFab y cFab/9aa

Las actividades de la IgG 166-32 quimérica y de los cFab y cFab/9aa se determinaron usando el ensayo hemolítico por la ruta alternativa del complemento anteriormente descrito. La Fig. 13 muestra que las formas murina y quimérica del MAb 166-32 poseen una potencia idéntica en cuanto a inhibir al factor D. La Fig. 14 muestra que los
25 cFab y cFab/9aa poseen una potencia casi idéntica en cuanto a inhibir al factor D. Y lo que es más importante, la potencia de las dos formas del Fab quimérico es idéntica a la de la IgG quimérica, teniendo en consideración que existen dos sitios de unión por molécula de IgG. En conjunto, estos resultados demuestran que la IgG quimérica y los cFab y cFab/9aa conservan la potencia del MAb 166-32 murino de origen.

30 Ejemplo 10: Protección de un daño tisular mediado por el complemento, ejercida por el Mab 166-32 en un modelo *ex vivo* de corazones de conejo perfundidos con plasma humano

La activación del sistema del complemento contribuye al rechazo hiperagudo de los xenotrasplantes. Este rechazo se puede producir como resultado de la unión de anticuerpos que fijan el complemento, de la activación directa del complemento a través de la ruta alternativa en la superficie de las células extrañas, y/o del fracaso de la regulación del complemento por parte del órgano extraño (J.L. Platt y col., *Transplantation*, 1991; 52: 937-947). Dependiendo de la interacción especie-especie particular, predomina la activación del complemento o a través de la ruta clásica o a través de la ruta alternativa, aunque en algunos casos ambas rutas pueden ser operativas (T. Takahashi y col., *Immunol Res.*, 1997; 16: 273-297). Estudios previos han mostrado que el rechazo hiperagudo se puede producir en ausencia de anticuerpos anti-donante, a través de la activación de la ruta alternativa (P.S. Johnston y col., *Transplant. Proc.*, 1991; 23: 877-879).

Para demostrar la importancia de la ruta alternativa del complemento en el daño tisular, el MAb 166-32 anti-factor D se ensayó usando un modelo *ex vivo* en el que corazones de conejo aislados se perfundieron con plasma humano diluido. Este modelo se había demostrado previamente que causaba daño en el miocardio de conejo debido a la activación de la ruta alternativa del complemento (M.R. Gralinski y col., *Immunopharmacology*, 1996; 34: 79-88).

(1) Corazones de conejo perfundidos con el sistema Langendorff:

45 Conejos blancos de Nueva Zelanda, machos (2,2 kg - 2,4 kg) se sacrificaron con eutanasia mediante dislocación cervical. Los corazones se extirparon con rapidez y se conectaron a una cánula para su perfusión a través de la aorta. El medio de perfusión consistió en un volumen recirculante (250 ml) de tampón de Krebs-Henseleit (K-H) modificado (pH 7,4, 37°C), suministrado a una velocidad constante de 20 ml/min - 25 ml/min. La composición del medio tamponado en milimoles por litro fue la siguiente: NaCl, 117; KCl, 4,0; CaCl₂·H₂O, 2,4; MgCl₂·6 H₂O, 1,2; NaHCO₃, 25; KH₂PO₄, 1,1; glucosa, 5,0; L-glutamato monosódico, 5,0; piruvato sódico, 2,0; y BSA, al 0,25% (p/v). El
50 tampón de K-H se hizo pasar a través de un "pulmón" poroso a los gases que consistía en un *Silastic™ Laboratory Grade Tubing* (Dow Corning, Midland, MI), de 55,49 metros de longitud, con un diámetro interno de 1,47 mm y un diámetro externo de 1,96 mm. El "pulmón" membranoso se expuso de manera continuada a una mezcla de O₂ al 95%/CO₂ al 5% para obtener una presión parcial de oxígeno en el medio de perfusión igual a 500 mm de Hg. El
55 ritmo de los corazones se estableció durante todo el protocolo, a través de electrodos conectados a la aurícula derecha. Los estímulos marcadores del ritmo (3 Hz, duración 4 milisegundos) se enviaron desde un generador de onda cuadrada para laboratorio (Grass SD-5, Quincy, MA). La arteria pulmonar se canuló con tubos de polietileno para facilitar la recogida del efuente de la arteria pulmonar, que representa el retorno venoso coronario. La vena

cava superior e inferior y las venas pulmonares se ligaron para impedir la salida del líquido del perfundido por los vasos cortados. Un drenaje ventricular izquierdo, una sonda de medición térmica con termistor y un balón de látex se insertaron a través de la aurícula izquierda y se colocaron en el ventrículo izquierdo. El balón de látex lleno de fluido se conectó con tubos rígidos a un transductor de presión para permitir medir la presión sistólica del ventrículo izquierdo y la presión telediastólica. La presión presentada en el ventrículo izquierdo se define como la diferencia entre la presión sistólica del ventrículo izquierdo y la presión telediastólica. El balón intraventricular se expandió con agua destilada para obtener una presión telediastólica inicial de referencia del ventrículo izquierdo de 5 mm de Hg. La presión de perfusión coronaria se midió con un transductor de presión conectado a un brazo lateral de la cánula aórtica. Todas las variables hemodinámicas se controlaron de manera continua usando un registro multicanal (*Grass Polygraph 79D*, Quincy, MA). Los corazones aislados se mantuvieron a 37°C durante todo el período del experimento encerrándolos en una cámara de vidrio de doble luz y de temperatura regulada, y haciendo pasar el medio de perfusión a través de un reservorio y sistema de distribución calentados.

(2) Tratamientos con anticuerpos:

Se usaron dos grupos de tratamiento para determinar la capacidad del MAb 166-32 anti-factor D para inhibir los efectos de la activación del complemento en corazones aislados de conejo, perfundidos con plasma humano. Grupo 1: Grupo negativo emparejado por isotipo constituido por corazones perfundidos con plasma humano al 4% en presencia una concentración de 0,3 µg/ml del MAb G3-519 específico para gp120 de HIV-1 (n = 6). Grupo 2: Grupo de tratamiento, constituido por corazones perfundidos con plasma humano al 4% en presencia de una concentración de 0,3 µg/ml del MAb 166-32 (n = 6). El plasma humano se separó de la sangre completa recién recogida y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización. Se eligió este porcentaje de plasma humano debido a que afecta gravemente a la función miocárdica durante una longitud de tiempo razonable y permite evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento. Concentraciones más altas de plasma humano en este sistema producen que el corazón presente rápidamente contracciones, haciendo difícil analizar los efectos de un fármaco a baja concentración. Estudios preliminares habían determinado que 0,3 µg/ml era la concentración mínima efectiva que podía proteger al corazón aislado de los efectos de la activación del complemento. Todos los corazones se sometieron a 10 - 15 minutos de equilibrado en el aparato de Langendorff antes de la adición de cualquiera de los dos anticuerpos al medio de perfusión. Diez minutos después de la adición de anticuerpo, se añadió plasma humano al 4% al medio de perfusión (250 ml, recirculante). Las variables hemodinámicas, que incluyen la presión de perfusión coronaria (CPP), presión sistólica del ventrículo izquierdo (LVSP) (del inglés, "*Left Ventricular Systolic Pressure*"), presión telediastólica del ventrículo izquierdo (LVEDP) (del inglés, "*Left Ventricular End-Diastolic Pressure*") y la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP) (del inglés, "*Left Ventricular Developed Pressure*") se registraron antes de la adición de anticuerpo (valores de referencia), antes de la adición de plasma humano al 4% y de ahí en adelante cada 10 minutos, durante 60 minutos.

El MAb 166-32 (0,3 µg/ml) atenuó la presión de perfusión coronaria (CPP) cuando se comparó con la de corazones tratados con el MAb G3-519 (0,3 µg/ml) cuando los corazones se expusieron a plasma humano al 4%. Un aumento en la CPP indica una resistencia vascular coronaria que suele estar asociada con un daño en el tejido miocárdico. Los corazones aislados de conejo, perfundidos con el MAb 166-32, mantuvieron la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (LVEDP), en marcado contraste con los resultados obtenidos con el MAb G3-519 (Fig. 15). Este último grupo de corazones presentó un aumento progresivo de la LVEDP después de la exposición a plasma humano al 4%, lo que indica la aparición de contracciones o de un fallo del ventrículo para relajarse durante la diástole (Fig. 15). El MAb 166-32 además atenuó el descenso de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (LVDP) en comparación con la de corazones tratados con el MAb G3-519 después de la exposición a plasma humano diluido. (Fig. 15).

La Fig. 16 representa registros representativos de la función cardíaca, obtenidos antes y después de 10, 30 y 60 minutos de perfusión en presencia de plasma humano al 4%. El aumento progresivo de la LVEDP y el descenso de la LVDP de un corazón de conejo tratado con el MAb G3-519 es obvio a los 10 minutos, con deterioro progresivo de la función ventricular durante los siguientes 50 minutos. Por otra parte, la conservación de la función ventricular de un corazón tratado con el MAb 166-32 es evidente durante el período de 60 minutos.

Considerados en su conjunto, estos datos hemodinámicos indican que el MAb 166-32 anti-factor D protege los corazones de conejo aislados de un daño mediado por el complemento de seres humanos, como se manifiesta por un mantenimiento general de la función miocárdica después de la exposición a plasma humano.

(3) Ensayo ELISA del Bb del complemento:

El factor D cataliza la escisión del factor B unido, proporcionando los fragmentos Ba y Bb. La concentración del Bb presente sirve como índice de la actividad del factor D. Las concentraciones del componente Bb activado en el fluido linfático recogido de corazones aislados de conejos, se midieron usando un kit para ELISA que se encuentra comercialmente disponible (Quidel). En los ensayos se usó un MAb dirigido contra Bb del complemento de seres humanos, para medir la activación del sistema del complemento de seres humanos durante la perfusión de corazones de conejo en presencia de plasma humano. El efluente linfático procedente de los vasos linfáticos cortados se recogió procedente del ápice del corazón, se sometió a congelación rápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta el momento del ensayo. La velocidad de flujo del efluente linfático se registró y se

determinó con el fin de normalizar la concentración de Bb.

Diez minutos después de la perfusión con plasma humano al 4% y en cada uno de los puntos de tiempo posteriores, una concentración de Bb significativamente más baja ($p < 0,05$) se encontró que estaba presente en los efluentes linfáticos procedentes de los corazones tratados con el MAb 166-32 cuando se comparó con la de corazones tratados con el MAb G3-519 (Fig. 17). El descenso en la producción del producto Bb de activación del complemento en los corazones de conejo tratados con MAb 166-32, confirma la actividad inhibidora de este anticuerpo sobre el factor D.

(4) Localización inmunohistoquímica del depósito de C5b-9:

Una vez finalizado el protocolo, los corazones se extrajeron del aparato de Langendorff, se cortaron en secciones transversales y se congelaron en nitrógeno líquido. El ápice y los tejidos auriculares se desecharon. Las secciones se incluyeron en medio de inclusión de compuestos OTC (*Miles, Inc.*, Ekhart, IN), se cortaron a tamaño de 3 μm y se colocaron sobre portaobjetos revestidos con poli-L-lisina. Después de lavadas con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), las secciones se incubaron con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente. Las secciones de corazón se lavaron con PBS y se incubaron con BSA al 1% durante 15 minutos para minimizar la tinción inespecífica. Después de lavadas con PBS, las secciones se incubaron con un Mab anti-C5b-9 humana (Quidel), procedente de múridos, en una dilución 1:1,000, a temperatura ambiente durante 1 hora. Las secciones se lavaron de nuevo con PBS y después se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con un anticuerpo anti-múridos, procedente de cabra, conjugado con FITC (Sigma), a una dilución de 1:320. Después de un lavado final con PBS, las secciones se montaron con Fluoromount-G (*Electron Microscopy Sciences*, Fort Washington, PA) y se protegieron con un cubreobjetos. Los controles incluyeron secciones en las que el anticuerpo primario se omitió, y secciones en las que el MAb anti-C5b-9 sustituyó a un anticuerpo IgG1 murino (Sigma), emparejado por isotipo.

Secciones de corazón procedentes de corazones tratados con el MAb 166-32 y el MAb G3-519, se estudiaron con respecto al depósito de MAC humano (o de C5b-9), mediante tinción por inmunofluorescencia. Los corazones tratados con el MAb 166-32 exhibieron una reducción en el depósito de MAC en comparación con los corazones tratados con MAb G3-519.

En definitiva, los datos resultantes de los estudios *ex vivo* de corazones de conejo demuestran la eficacia del MAb 166-32 en cuanto a prevenir un daño del tejido cardíaco, como resultado de la inhibición de la ruta alternativa del complemento. La inhibición de la activación del complemento se ha demostrado que prolonga la supervivencia de los xenotrasplantes (S.C. Makrides, *Pharmacological Rev.*, 1998, 50: 59-87). Por lo tanto, el MAb 166-32 se podría usar potencialmente como agente terapéutico para proteger a xenotrasplantes de ser destruidos por el plasma humano.

Ejemplo 11: Efectos inhibidores del MAb 166-32 sobre la activación del complemento y sobre reacciones inflamatorias en un modelo de circulación extracorpórea cardiopulmonar

Los pacientes que han sido sometidos a circulación extracorpórea cardiopulmonar (CPB) (del inglés, "*Cardiopulmonary Bypass*") manifiestan con frecuencia un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica generalizada. Clínicamente, estas reacciones se reflejan en leucocitosis postoperatoria, fiebre y acumulación de fluido extravascular, que pueden dar lugar a una recuperación larga y en ocasiones con una grave disfunción orgánica (J.K. Kirklin y col., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1983; 86: 845-857; L. Nilsson y col., *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1988; 22: 51-53; P.W. Weerwind y col., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1995; 110: 1633-1641). La respuesta inflamatoria consiste en cambios humorales y celulares que contribuyen tanto al daño tisular como a problemas en la hemostasia. Se ha implicado a la activación del complemento como la causa importante de la reacción inflamatoria sistémica (P. Haslam y col., *Anaesthesia*, 1980; 25: 22-26; A. Salama y col., *N. Eng. J. Med.*, 1980; 318: 408-414; J. Steinberg y col., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1993; 106: 1008-1016). La activación del complemento se atribuye a la interacción entre la sangre y la superficie de las máquinas de la CPB que constituyen el circuito extracorpóreo (D. Royston, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, 1997; 11: 341-354). Después de la activación del sistema del complemento se generan sustancias inflamatorias primarias que incluyen las anafilotoxinas C3a y C5a, la opsonina C3b el complejo C5b-9 de ataque a la membrana. Se ha demostrado que C5a regula por incremento la CD11b (integrina) y CD18 (integrina) del complejo MAC-1 en células polimorfonucleares PMN (que comprenden principalmente neutrófilos) *in vitro* (M.P. Fletcher y col., *Am. J. Physiol.*, 1993; 265: H1750-H1761) e induce la liberación de enzimas lisosómicas por parte de las células PMN. C5b-9 es capaz de inducir la expresión de la P-selectina (CD62P) en plaquetas (T. Wiedmer y col., *Blood*, 1991; 78: 2880-2886) y tanto C5a como C5b-9 inducen la expresión en superficie de la P-selectina sobre células endoteliales (K.E. Foreman y col., *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 1147-1155). C3a y C5a estimulan la quimiotaxis de las células cebadas humanas (K. Hartmann y col., *Blood*, 1997; 89: 2868-2870) y desencadenan la liberación de histamina (Y. Kubota, *J. Dermatol.*, 1992; 19: 19-26) lo cual induce la permeabilidad celular (T. J. Williams, *Agents Actions*, 1983; 13: 451-455).

La recirculación *in vitro* de sangre completa en un circuito de circulación extracorpórea se ha usado mucho como modelo para estimular leucocitos (J. Kappelamyer y col., *Circ. Res.*, 1993; 72: 1075-1081; N. Moat y col., *Ann. Thorac. Surg.*, 1993; 56: 1509-1514; C.S. Rinder y col., *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1564-1572), plaquetas (V.L. Jr. Hennesy y col., *Am. J. Physiol.*, 1977; 2132: H622-H628; Y. Wachtfogel y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 1985; 105: 601-

607; C. S. Rinder y col., *ibidem*) y activación del complemento (P.G. Loubser, *Perfusion*, 1987; 2: 219-222; C.S. Rinder y col., *ibidem*; S.T. Baksaas y col., *Perfusion*, 1998; 13: 429-436) en CPB. La efectividad del MAb 166-32 anti-factor D en inhibir la activación celular y del complemento en sangre completa humana, se estudió usando este modelo de circulación extracorpórea por CPB.

5 (1) Preparación del circuito extracorpóreo:

Los circuitos extracorpóreos se ensamblaron usando un oxigenador de membrana pediátrico, de fibra hueca, que llevaba integrado un módulo intercambiador de calor (D901 LILLPUT 1; DIDECO, Mirandola (MO), Italia), un reservorio venoso pediátrico que llevaba integrado un filtro de cardiología (D 752 Venomidicard; DIDECO), un equipo de tubos de perfusión (*Sorin Biomedical, Inc.*, Irvine, CA) y una bomba de rodillo multiflujo (*Stockert Instruments GmbH*, Munich, Alemania). El oxigenador y el sistema de circuitos eléctricos se cebaron con la disolución Plasma-Lyte 148 (*Baxter Healthcare Corp.*, Deerfield, IL). El cebador se calentó a 32°C con un enfriador-calentador (Sams; *3M Health Care*, Ann Arbor, MI) y se hizo circular a 500 ml/min, mientras que el flujo del gas de barrido se mantuvo a 0,25 litros por min usando oxígeno al 100%. El gas de barrido se cambió por una mezcla de oxígeno (95%) y dióxido de carbono (5%) después de que la sangre se hubo añadido al circuito. El pH, PCO₂, PO₂ y la temperatura del perfundido se controlaron continuamente a lo largo de todo el periodo de recirculación. Se añadió bicarbonato sódico a medida que se requirió para mantener el pH en el intervalo de 7,25 - 7,40.

(2) Operación y recogida de muestras en un circuito extracorpóreo:

Se recogieron 450 ml de sangre durante 5 - 10 minutos procedente de voluntarios sanos no medicados, en el interior de una bolsa de transferencia (*Haemo-Pak; Charteredmed, Inc.*, Lakewood, NJ) que contenía heparina porcina (concentración final de 5 unidades/ml; Elkins-Sinn, Cherry Hill, NJ) y el MAb 166-32 anti-factor D o el MAb G3-519 de control negativo, emparentado por isotipo (concentración final de 18 µg/ml). Esta concentración de anticuerpo es equivalente a aproximadamente 1,5 veces la concentración molar del factor D en la sangre. Antes de la adición de la sangre al circuito extracorpóreo, se recogió una muestra de sangre de la bolsa de transferencia considerada como la muestra "pre-circuito", designada "muestra -10 minutos". La sangre se añadió luego al reservorio a través de la entrada para el cebador. El fluido del cebador fue simultáneamente retirado lejos de la salida del oxigenador, para obtener un volumen final de circuito de 600 ml y un hematocrito final de 25% - 28%. La sangre se hizo circular con el cebador y la mezcla completa se realizó en 3 minutos; se extrajo una muestra inicial de referencia y se designó como el tiempo 0. Para imitar procedimientos usuales de operaciones quirúrgicas en condiciones de hipotermia, el circuito se enfrió luego hasta 27°C durante 70 minutos, después de lo cual el circuito se recalentó hasta 27°C durante 70, minutos, pasados los cuales el circuito se calentó de nuevo a 37°C durante otros 50 minutos (durante un total de 120 minutos de recirculación).

También se extrajeron muestras de sangre a los 10, 25, 40, 55, 70, 80 y 120 minutos durante la recirculación. Las muestras de plasma se prepararon mediante centrifugación inmediata a 2.000 ×g a 40°C. Las partes alícuotas para los ensayos hemolíticos por la ruta alternativa y para los ensayos de la mieloperoxidasa específica de neutrófilos se sometieron a congelación rápida en nieve carbónica y después se almacenaron a -80°C. Las partes alícuotas destinadas a la medida de C3a, C4d, sC5b-9 y Bb del complemento mediante el ensayo ELISA, se mezclaron inmediatamente con un volumen igual de medio *Specimen Stabilizing Medium* (Quidel), se sometieron a congelación rápida en nieve carbónica después se almacenaron a -80°C. También se recogieron muestras de sangre completa para la inmunotinción de los marcadores de superficie celular CD11b y CD62P, dispuestos sobre neutrófilos y plaquetas respectivamente. Para impedir la posterior activación del complemento de las muestras de sangre completa durante el procedimiento de tinción, se añadieron 10 µl de EDTA 1 M a cada ml de sangre completa para dar lugar a una concentración final 10 mM.

(3) Ensayos hemolíticos por la ruta alternativa:

La actividad del complemento por la ruta alternativa en las muestras de plasma recogidas a diferentes puntos de tiempo del circuito tratado con MAb 166-32 y del circuito tratado con MAb G3-519, se ensayaron usando glóbulos rojos de conejo según se ha descrito en lo que antecede. Se mezclaron 50 µl de cada una de las muestras (20%) con 50 µl de tampón de GVB/Mg-EGTA antes de la edición de 30 µl de glóbulos rojos de conejo (1,7 × 10⁸ células/ml). Después de una incubación a 37°C durante 30 minutos, los sobrenadantes se recogieron y la OD se leyó a 405 nm usando un aparato de lectura para ELISA.

La Fig. 18 muestra que la actividad del complemento por la ruta alternativa en el circuito tratado con el MAb 166-32 fue inhibida por completo por el anticuerpo, mientras que el MAb G3-519 no tuvo ningún efecto sobre la actividad del complemento cuando se usó en su correspondiente circuito. Los resultados indican que el MAb 166-32 es un potente inhibidor de la ruta alternativa del complemento. Incluso a una relación molar de sólo 1,5:1 (MAb:factor D), el MAb 166-32 es capaz de inhibir por completo la actividad del complemento por la ruta alternativa.

(4) Ensayos de productos de la activación del complemento:

Además de los ensayos hemolíticos descritos en lo que antecede, las muestras de plasma procedentes de los dos circuitos extracorpóreos se ensayaron con respecto a los niveles de C3a, sC5b-9, Bb y C4d. Estas sustancias se cuantificaron usando kits para el ensayo ELISA comercialmente disponibles (Quidel) según los manuales del

fabricante. Al igual que C5a, sC5b-9 es un marcador alternativo de la actividad de la convertasa de C5 en la cascada del complemento. Tanto C5a como sC5b-9 se producen como resultado de la escisión de C5 por acción de la convertasa de C5. El Bb del complemento es un marcador específico de la activación de la ruta alternativa del complemento, mientras que C4d es un marcador específico de la activación de la ruta clásica.

5 Las Figs. 19 y 20 muestran que el MAb 166-32 inhibió de manera efectiva la producción de C3a y sC5b-9 respectivamente, mientras que el MAb G3-519 de control negativo, emparejado por isotipo, no la inhibió. La especificidad y la potencia del MAb 166-32 se esclarecen más en las Figs. 21 y 22. La producción de Bb por la ruta alternativa del complemento fue inhibida completamente por el MAb 166-32, mientras que los niveles de Bb en el
10 circuito tratado con MAb G3-519 aumentan a lo largo del tiempo durante la recirculación. Curiosamente, los niveles de C4d, tanto en el circuito tratado con MAb 166-32 como en el circuito tratado con G3-519, no variaron significativamente a lo largo del tiempo. Estos últimos resultados sobre los niveles de Bb y C4d indican claramente que la activación del complemento en la circulación extracorpórea está mediada principalmente a través de la ruta alternativa.

15 En resumen, los resultados indican que el MAb 166-32 es un potente inhibidor de la ruta alternativa del complemento. La inhibición del factor D es capaz de suprimir la activación del complemento en las posteriores etapas de la cascada, como se manifiesta por la disminución de la formación de C3a y sC5b-9.

(5) Ensayos de activación de neutrófilos y plaquetas:

20 La activación de los neutrófilos y las plaquetas se cuantificó midiendo los niveles de la expresión de CD11b y CD62P en la superficie celular de neutrófilos y plaquetas respectivamente. Para el marcaje de neutrófilos con CD11b, 100 µl de sangre completa recogida de los circuitos, se incubaron inmediatamente con 20 µl de anticuerpo anti-CD11b conjugado con ficoeritrina (PE) (del inglés, "*Phycoerythrin*") (clon D12, *Becton Dickinson*, San Jose, CA) durante 10 minutos a temperatura ambiente en un tubo de microcentrifuga. A continuación se añadieron 1,4 ml de disolución de lisis FACS (Becton Dickinson) durante 10 minutos, a temperatura ambiente, para lisar los glóbulos rojos y para fijar
25 y las células se resuspendieron en PBS para su lavado. Los tubos de microcentrifuga se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron por último en 0,5 ml de paraformaldehído al 1% durante toda la noche antes de su análisis usando un citómetro de flujo EPIC-XL (*Coulter Corp.*, Miami, FL). En un marcaje doble para identificar al mismo tiempo la población de neutrófilos, se añadieron 5 µl de anticuerpo anti-CD15 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clon MMA, *Becton Dickinson*) para su incubación junto con el anticuerpo anti-CD11b conjugado con PE.
30

35 Para el marcaje de las plaquetas con CD62P, 40 µl de sangre completa recogida de los circuitos, se incubaron acto seguido con 20 µl de anticuerpo anti-CD62P conjugado con PE (clon AC1.2, *Becton Dickinson*) durante 10 minutos a temperatura ambiente en un tubo de microcentrifuga. A continuación la mezcla se trató con disolución de lisis de FACS como se ha descrito en lo que antecede. Los tubos de microcentrifuga se centrifugaron a 2.000 x g durante 5 minutos. Las plaquetas se lavaron en PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% y luego se analizaron según se ha descrito en lo que antecede. En un marcaje doble para identificar al mismo tiempo la población de plaquetas, se añadieron 5 µl de anticuerpo anti-CD42a conjugado con FITC para su incubación junto con el anticuerpo anti-CD62P conjugado con PE.

40 Para la medida mediante citometría de flujo, las poblaciones de PMN (que contienen principalmente neutrófilos) y de plaquetas se identificaron mediante selección en directo a través de acotamiento basado en parámetros de dispersión frontal frente a dispersión lateral, y tinción específica con anticuerpo anti-CD15 conjugado con FITC y con anticuerpo anti-CD42a conjugado con FITC, respectivamente. El acotamiento de la tinción de fondo se realizó usando anticuerpos marcados y emparejados por isotipo. La intensidad de la expresión de CD11b y CD62P se representó por medio de la intensidad de fluorescencia media (MFI).

45 La Fig. 23 muestra que los neutrófilos procedentes del circuito extracorpóreo tratado con MAb 166-32 mostraron una expresión sustancialmente más baja de CD11b en comparación con la de los procedentes del circuito tratado con MAb G3-519. Estos datos, junto con los demás datos anteriormente mencionados, indican que la inhibición de la activación del complemento por la ruta alternativa por acción del MAb 166-32 es capaz de impedir la activación de los neutrófilos.

50 De manera similar, la Fig. 24 muestra que las plaquetas procedentes de circuitos extracorpóreos tratados con MAb 166-32 mostraron una expresión sustancialmente más baja de CD62P en comparación con las procedentes del circuito tratado con MAb G3-519. También esta vez, estos datos, junto con los demás datos anteriormente mencionados, indican que la inhibición de la activación del complemento por la ruta alternativa por acción del MAb 166-32 es capaz de impedir la activación de las plaquetas.

55 (6) Ensayo de la mieloperoxidasa (MPO) específica de neutrófilos

El grado de activación de los neutrófilos se midió también usando un kit comercial para el ensayo ELISA (*R&D Systems, Inc.*, Minneapolis, MN) para cuantificar la cantidad de mieloperoxidasa (MPO) específica de neutrófilos presente en las muestras de plasma procedentes de los circuitos extracorpóreos. La MPO se almacena en los

gránulos primarios (azurófilos) de los neutrófilos. Se libera cuando los neutrófilos experimentan desgranulación durante la activación. Por lo tanto, la MPO es un marcador soluble de la activación de los neutrófilos. Los ensayos se realizaron conforme al manual del fabricante. Brevemente expuesto, las muestras se incubaron en las celdas de una microplaca, que se habían revestido con un primer anticuerpo dirigido contra MPO. El complejo MPO-MAb se marca con un anticuerpo policlonal unido a biotina, preparado a partir de un antisuero anti-MPO de cabra. La etapa final del ensayo se basa en un acoplamiento de biotina-avidina en el que la avidina ha sido unida covalentemente a fosfatasa alcalina. La cantidad de MPO en cada muestra se mide por métodos enzimáticos después de la adición del sustrato fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP) (del inglés, "*4-Nitro-Phenyl-Phosphate*"), leyendo la OD a 405 nm.

La Fig. 25 muestra que los niveles de MPO en el circuito tratado con MAb 166-32 fueron sustancialmente más bajos que los del circuito tratado con MAb G3-519. Estos resultados corroboran los obtenidos sobre la expresión de CD11b en los estudios inmunofluorométricos anteriormente descritos.

Considerados en su conjunto, estos datos sobre el complemento, neutrófilos y plaquetas apoyan la idea de que una inhibición efectiva de la activación del complemento por la ruta alternativa, en la circulación extracorpórea, por acción del MAb 166-32 anti-factor D, es capaz de suprimir la formación de las sustancias inflamatorias C3a, C5a y sC5b-9, y de esta manera disminuir la activación de los neutrófilos y las plaquetas. Se prevé que el MAb 166-32, así como sus fragmentos, homólogos, análogos, y sus correspondientes moléculas pequeñas, serán efectivos en cuanto a prevenir o disminuir reacciones inflamatorias clínicas causadas por CPB.

Ejemplo 12: Estudio de los efectos del MAb 166-32 en un modelo de daño debido a isquemia y reperfusión en perros

Se diseñó un estudio para investigar si el MAb 166-32 protegería los tejidos miocárdicos de un daño debido a isquemia y reperfusión en perros, aunque al principio se reconoció que el perro pudiera no ser un modelo animal conveniente para estudiar esta indicación del MAb 166-32. La capacidad del MAb 166-32 para neutralizar el factor D de perros en ensayos hemolíticos fue al menos 10 veces menos efectiva en comparación con la del factor D humano (véase el Ejemplo 7). Debido a la cantidad limitada de MAb 166-32 de la que se podía disponer en aquel momento, el MAb 166-32 se administró al corazón a través del vaso sanguíneo intracoronario. Se esperaba que el anticuerpo aumentaría a una concentración de al menos 60 µg/ml en la sangre coronaria con el fin de inhibir por completo el factor D de perro en el corazón. Se calculó que la dosificación fuera de 3,15 mg/kg/infusión durante 6 infusiones. El MAb G3-519 se usó como el control emparejado por isotipo en este estudio.

Brevemente expuesto, perros de caza criados para este fin se anestesiaron. Se llevó a cabo una toracotomía izquierda en el cuarto espacio intercostal para exponer el corazón. La arteria coronaria circunfleja izquierda proximal se aisló y se ligó durante 90 minutos para la inducción de isquemia, que fue seguida de 6 horas de reperfusión. El anticuerpo se administró 6 veces, 30 minutos antes de la isquemia, 10 minutos antes de la reperfusión y después a los 75, 150, 225 y 300 minutos durante la reperfusión. Se inyectaron microesferas radioactivas a diferentes puntos de tiempo para medir el flujo sanguíneo regional. Al final de los experimentos, los corazones se perfundieron con colorante azul de Evans y trifeniltetrazolio para medir respectivamente el área en riesgo y el tamaño del infarto. Se recogieron linfa y sangre completa coronarias procedentes de la vena yugular, antes de la isquemia y al final del experimento. Estas muestras se usaron para medir la concentración de los anticuerpos inyectados y la actividad hemolítica de la ruta alternativa.

Los resultados muestran que la concentración más alta que se pudo alcanzar del MAb 166-32 en la linfa coronaria fue de aproximadamente 30 µg/ml, que está muy por debajo de la concentración requerida para la inhibición completa del factor D de perro en la circulación coronaria. El anticuerpo también se detectó en la circulación sistémica, lo que sugiere que el anticuerpo inyectado se dispersó fuera del corazón. Los datos obtenidos de los ensayos hemolíticos muestran que la actividad del complemento por la ruta alternativa no se redujo, ya que concuerda con el hecho de que la concentración del anticuerpo fue baja. Por no tanto, no es posible sacar una conclusión sobre el efecto del MAb 166-32 en la reperfusión a partir de estos experimentos en perros.

La invención está limitada únicamente por las reivindicaciones que siguen a continuación y no por ninguna afirmación expresada en alguna otra parte de este documento o en alguna otra fuente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNG, Sek Chung "Michael" SUN, William SUN, Cecily

<120> Inhibidores de la activación del complemento

<130> 98-02

5 <140> PCT/US99/03566
<141> 19-02-1999

<150> US 60/075,328
<151> 20-02-1998

<160> 15

10 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 699
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

cggatcctgg gcggcagaga ggccgaggcg cacgcgcggc cctacatggc gtcggtgcag      60
ctgaacggcg cgcacctgtg cggcggcgtc ctggtggcgg agcagtgggt gctgagcgcg      120
gcgcactgcc tggaggacgc ggccgacggg aagggtgcagg ttctcctggg cgcgcactcc      180
ctgtcgcagc cggagccctc caagcgcctg tacgacgtgc tccgcgcagt gccccacccg      240
gacagccagc ccgacaccat cgaccacgac ctccctgctg tacagctgtc ggagaaggcc      300
aactgggcc ctgctgtgcg ccccctgccc tggcagcgcg tggaccgca cgtggcaccg      360
ggaactctct gcgacgtggc cggctggggc atagtcaacc acgcggggcc cgcgccggac      420
agcctgcagc acgtgctctt gccagtgtg gaccgcgcca cctgcaaccg gcgcacgcac      480
cacgacggcg ccatcaccga gcgcttgatg tgcgcggaga gcaatcgccg ggacagctgc      540
aagggtgact ccggggggccc gctggtgtgc gggggcgtgc tcgagggcgt ggtcacctcg      600
ggctcgcgcg tttgcggcaa ccgcaagaag cccgggatct acaccgcgt ggcgagctat      660
gcggcctgga tcgacagcgt cctggcctag taggaattc      699
    
```

<210> 2
<211> 228
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 2

```

Ile Leu Gly Gly Arg Glu Ala Glu Ala His Ala Arg Pro Tyr Met Ala
1           5           10
Ser Val Gln Leu Asn Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Val Leu Val Ala
20          25          30
Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala Ala His Cys Leu Glu Asp Ala Ala Asp
35          40          45
    
```

ES 2 446 930 T3

Gly Lys Val Gln Val Leu Leu Gly Ala His Ser Leu Ser Gln Pro Glu
 50 55 60
 Pro Ser Lys Arg Leu Tyr Asp Val Leu Arg Ala Val Pro His Pro Asp
 65 70 75 80
 Ser Gln Pro Asp Thr Ile Asp His Asp Leu Leu Leu Leu Gln Leu Ser
 85 90 95
 Glu Lys Ala Thr Leu Gly Pro Ala Val Arg Pro Leu Pro Trp Gln Arg
 100 105 110
 Val Asp Arg Asp Val Ala Pro Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp
 115 120 125
 Gly Ile Val Asn His Ala Gly Arg Arg Pro Asp Ser Leu Gln His Val
 130 135 140
 Leu Leu Pro Val Leu Asp Arg Ala Thr Cys Asp Arg Arg Thr His His
 145 150 155 160
 Asp Gly Ala Ile Thr Glu Arg Leu Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg
 165 170 175
 Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly Val
 180 185 190
 Leu Glu Gly Val Val Thr Ser Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Arg Lys
 195 200 205
 Lys Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Val Ala Ser Tyr Ala Ala Trp Ile Asp
 210 215 220

Ser Val Leu Ala
 225

<210> 3
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> sus sp.

5

<400> 3

cggatcctggtgtggccagga ggccaagtcc cacgagagac cctacatggc atcgggtgcag 60
 gtgaacggca agcacgtgtg cggaggcttc ctggtgtctg agcagtgggt gctgagtgca 120
 gcacactgcc tggaggacgt ggccgagggg aagctgcagg ttctcctggg tgcgcactcc 180
 ctgtcacagc ccgagccctc gaagcgctg tacgacgtgc tccgcgccgt gccccacca 240
 gacagccagc ctgacaccat cgaccatgat ctctcctgc tgaagctctc cgagaaggcc 300
 gagctgggcc ctgccgtgca gccccttgcc tggcaacgag aggaccacga ggttccggca 360

ES 2 446 930 T3

ggcacgctct gcgacgtggc cggctgggga gtggtcagtc aactggccg ccggcccgcac 420
 cgtctgcagc acctgctcct accggtgctg gaccgcacca cctgcaacct gcgcacatac 480
 cacgatggca ccatcaccga gcgcatgatg tgcgcggaga gcaaccgctc ggacagctgc 540
 aagggcgact ccggaggccc gctggtgtgc gggggtgtgg ccgagggagt ggttacctca 600
 ggctcccag tctgcggcaa ccgcaagaaa cccggcatct acacgcgctt ggcgagctac 660
 gtggcctgga tcgacggagt gatggctgac agcgcagccg cctagtagga attc 714

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

5

<400> 4

Ile Leu Gly Gly Gln Glu Ala Lys Ser His Glu Arg Pro Tyr Met Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Gln Val Asn Gly Lys His Val Cys Gly Gly Phe Leu Val Ser
 20 25 30
 Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala Ala His Cys Leu Glu Asp Val Ala Glu
 35 40 45
 Gly Lys Leu Gln Val Leu Leu Gly Ala His Ser Leu Ser Gln Pro Glu
 50 55 60
 Pro Ser Lys Arg Leu Tyr Asp Val Leu Arg Ala Val Pro His Pro Asp
 65 70 75 80
 Ser Gln Pro Asp Thr Ile Asp His Asp Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ser
 85 90 95
 Glu Lys Ala Glu Leu Gly Pro Ala Val Gln Pro Leu Ala Trp Gln Arg
 100 105 110
 Glu Asp His Glu Val Pro Ala Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp
 115 120 125
 Gly Val Val Ser His Thr Gly Arg Arg Pro Asp Arg Leu Gln His Leu
 130 135 140
 Leu Leu Pro Val Leu Asp Arg Thr Thr Cys Asn Leu Arg Thr Tyr His
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Ile Thr Glu Arg Met Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg
 165 170 175
 Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly Val
 180 185 190

ES 2 446 930 T3

Ala Glu Gly val val Thr Ser Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Arg Lys
 195 200 205

Lys Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Leu Ala Ser Tyr Val Ala Trp Ile Asp
 210 215 220

Gly val Met Ala Asp Ser Ala Ala Ala
 225 230

- <210> 5
- <211> 25
- <212> DNA
- 5 <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> CEBADOR PARA CADENA DE VK DE 166-32
- <400> 5
- tgcggccgct gtagtgctg tcttt 25
- 10 <210> 6
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- 15 <223> CEBADOR PARA GEN DE VK DE 166-32
- <400> 6
- ggaattcact cgttattctc gga 23
- <210> 7
- <211> 17
- 20 <212> DNA
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> ADAPTADOR HIBRIDADO PARA CLONAR EL GEN DE VK DE 166-32
- <400> 7
- 25 tccgagaata acgagtg 17
- <210> 8
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> ARTIFICIAL
- 30 <220>
- <223> CEBADOR DE GEN DE VH DE 166-32
- <400> 8
- cattgaaagc ttggggtag aagttgttc 29
- <210> 9
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> CEBADOR PARA EL GEN DE VH DE 166-32
- <400> 9
- 40 cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27
- <210> 10
- <211> 28
- <212> DNA
- 45 <213> ARTIFICIAL

ES 2 446 930 T3

<220>
 <223> CEBADOR PARA CLONAR EL GEN DE VH DE 166-32

<400> 10
 cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28

5 <210> 11
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CEBADOR PARA LA REGIÓN FD DE 166-32

10 <400> 11
 aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact 37

<210> 12
 <211> 31
 15 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CEBADOR PARA LA REGIÓN FD DE 166-32

20 <400> 12
 cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>
 <223> CEBADOR PARA LA REGIÓN FD DE 166-32

<400> 13
 aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 14
 <211> 26
 30 <212> DNA
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CEBADOR PARA LA REGIÓN FD DE 166-32

35 <400> 14
 cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Residuos de aminoácidos para la región bisagra de la IgG1 humana

<400> 15
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1 5

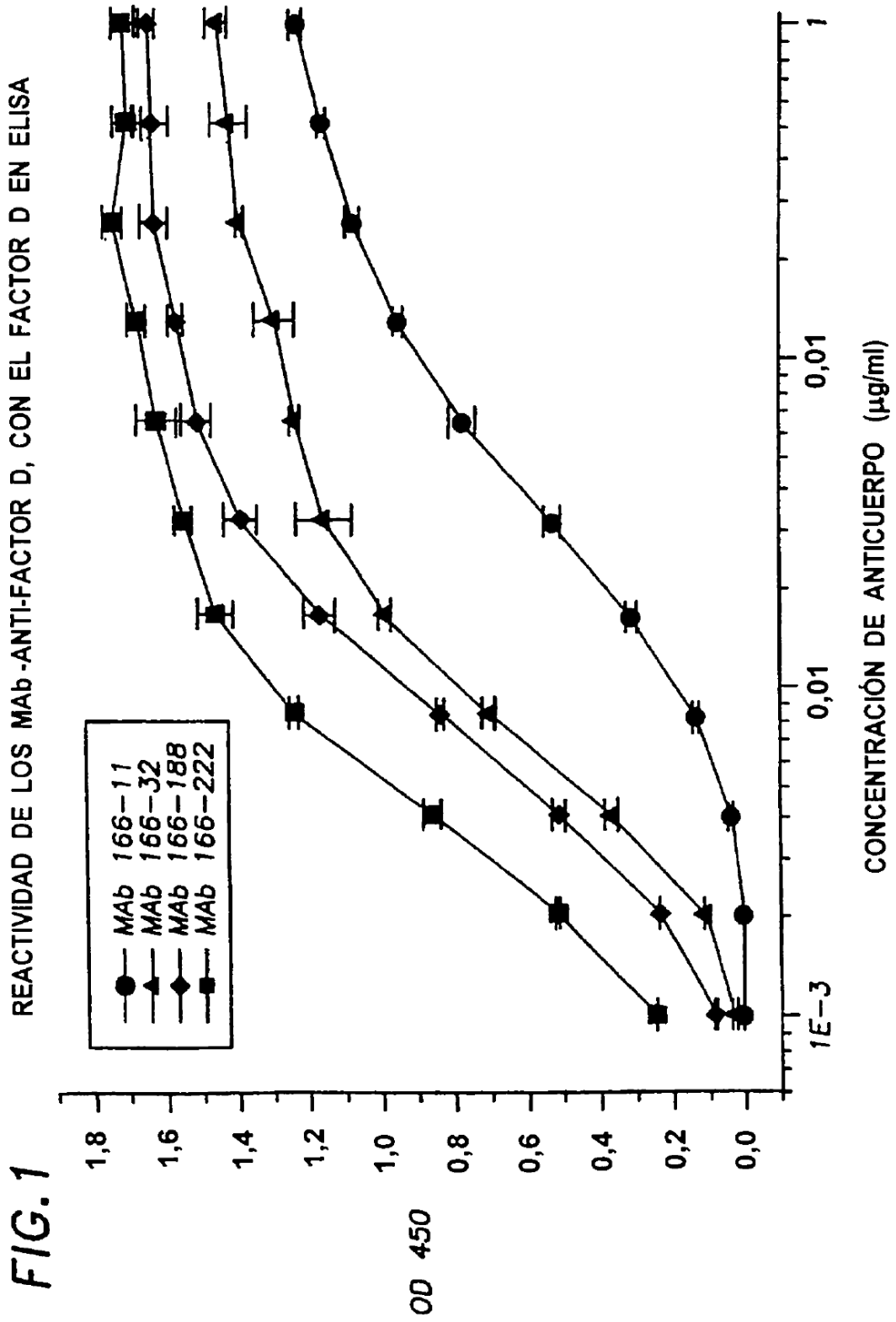
45

REIVINDICACIONES

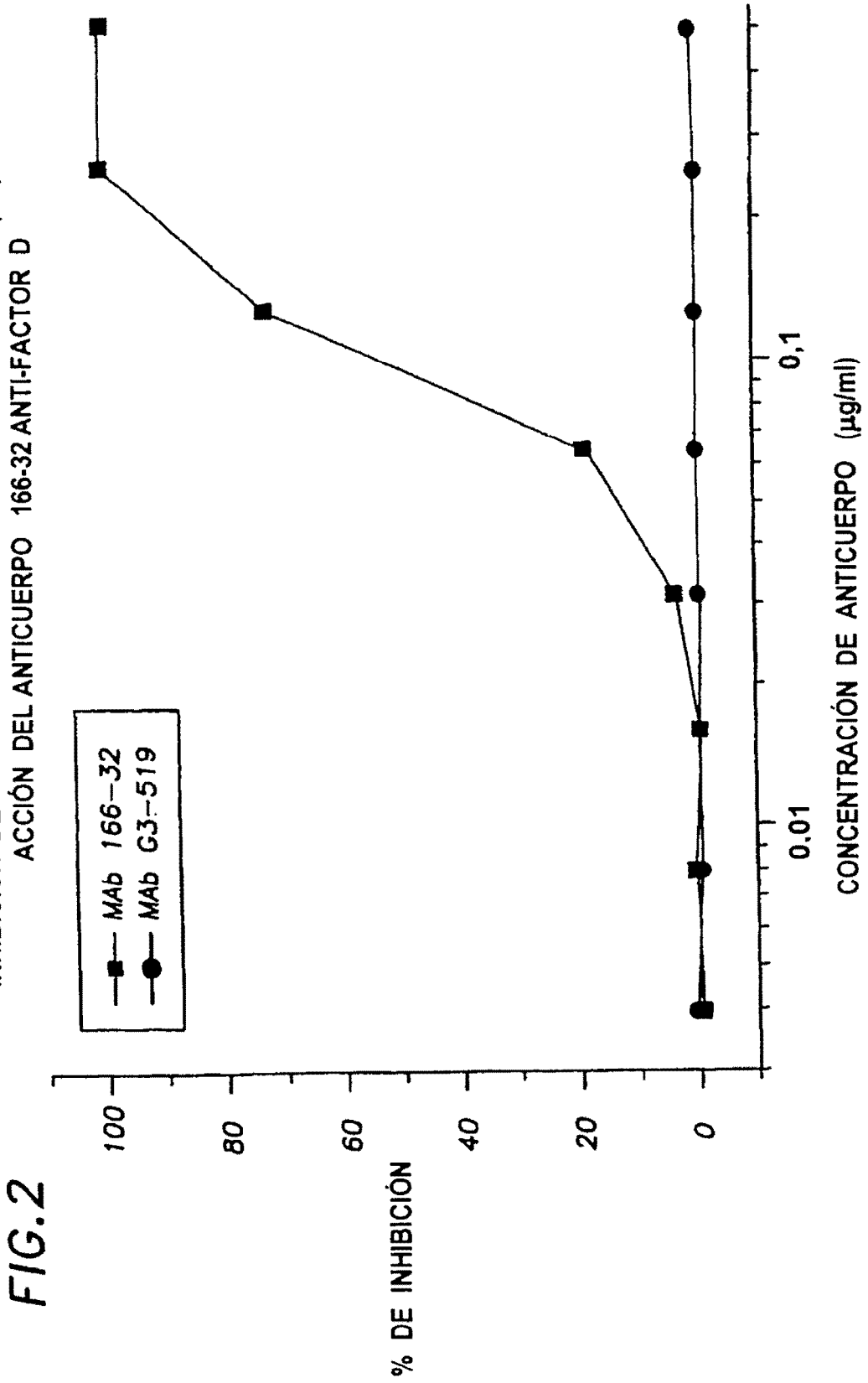
1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que es un Fab, (Fab')₂, Fv o Fv monocatenario, que
 - (i) se une al mismo epítipo sobre factor D humano que el anticuerpo monoclonal 166-32 producido por el hibridoma depositado en la American Type Culture Collection con el número de Registro HB-12476, y
 - (ii) inhibe la activación del complemento de la ruta alternativa en una relación molar de anticuerpo a factor D de 1,5:1.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado, desinmunizado o humano.
3. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que
 - 10 comprende una región variable de ratón y una región constante humana.
4. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 1, en el que el fragmento es un fragmento Fab quimérico que comprende una región variable de ratón y una región constante humana del fragmento Fab.
5. El anticuerpo o fragmento según la reivindicación 3 o 4, en el que la región variable de ratón es la región variable del anticuerpo monoclonal 166-32.
- 15 6. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal o el fragmento del mismo según la reivindicación 1.
7. Una línea celular que produce el fragmento Fab quimérico según la reivindicación 4.
8. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso en el tratamiento de enfermedades o situaciones que están mediadas por una activación excesiva o incontrolada del sistema del complemento seleccionadas del grupo que consiste en: daño tisular debido a la isquemia-reperfusión posterior a un
 - 20 infarto agudo de miocardio, aneurisma, ictus apoplético, choque hemorrágico, daño por aplastamiento, fracaso multiorgánico, choque hipovolémico e isquemia intestinal; trastornos inflamatorios tales como quemaduras, endotoxemia y choque septicémico, síndrome de insuficiencia respiratoria en el adulto, hemodiálisis; choque anafiláctico, asma grave, angioedema, enfermedad de Crohn, anemia de células falciformes, glomerulonefritis postestreptocócica y pancreatitis; rechazo de trasplantes tal como rechazo hiperagudo de xenotrasplantes;
 - 25 reacciones adversas frente a fármacos tales como alergia medicamentosa, síndrome de fuga vascular inducido por IL-2 y alergia a medios de contraste radiográfico; y trastornos autoinmunitarios tales como lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple
9. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el uso en el tratamiento del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado con la circulación extracorpórea cardiopulmonar.
- 30 10. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o fragmento se va a administrar mediante infusión intravenosa, inyección intravenosa en bolo, y las vías intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intrarraquídea, intracraneal u oral.
11. El anticuerpo o fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la dosificación de dicho anticuerpo o fragmento está entre 10 y 500 mg/ml de suero.

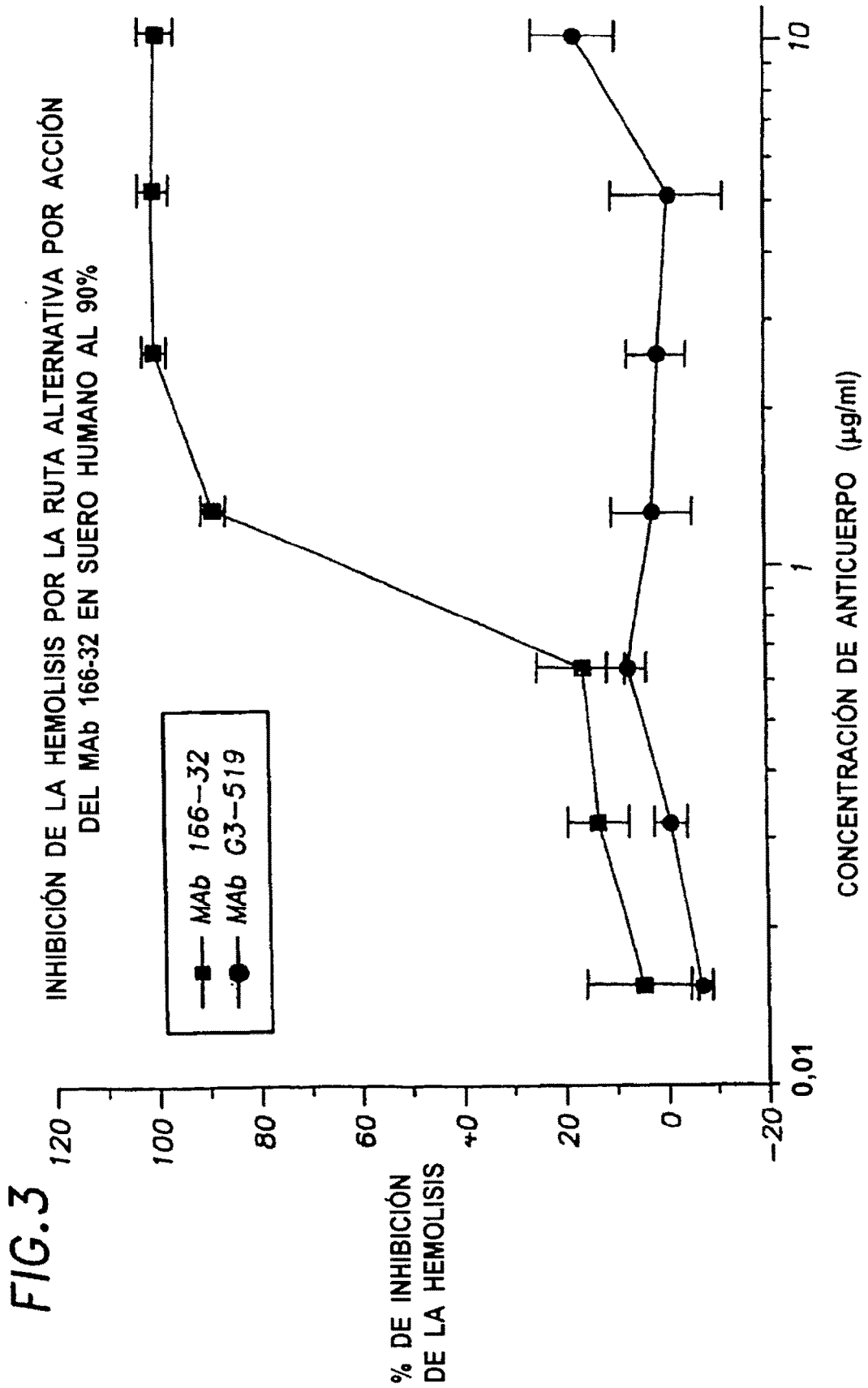
35

REACTIVIDAD DE LOS MAb -ANTI-FACTOR D, CON EL FACTOR D EN ELISA



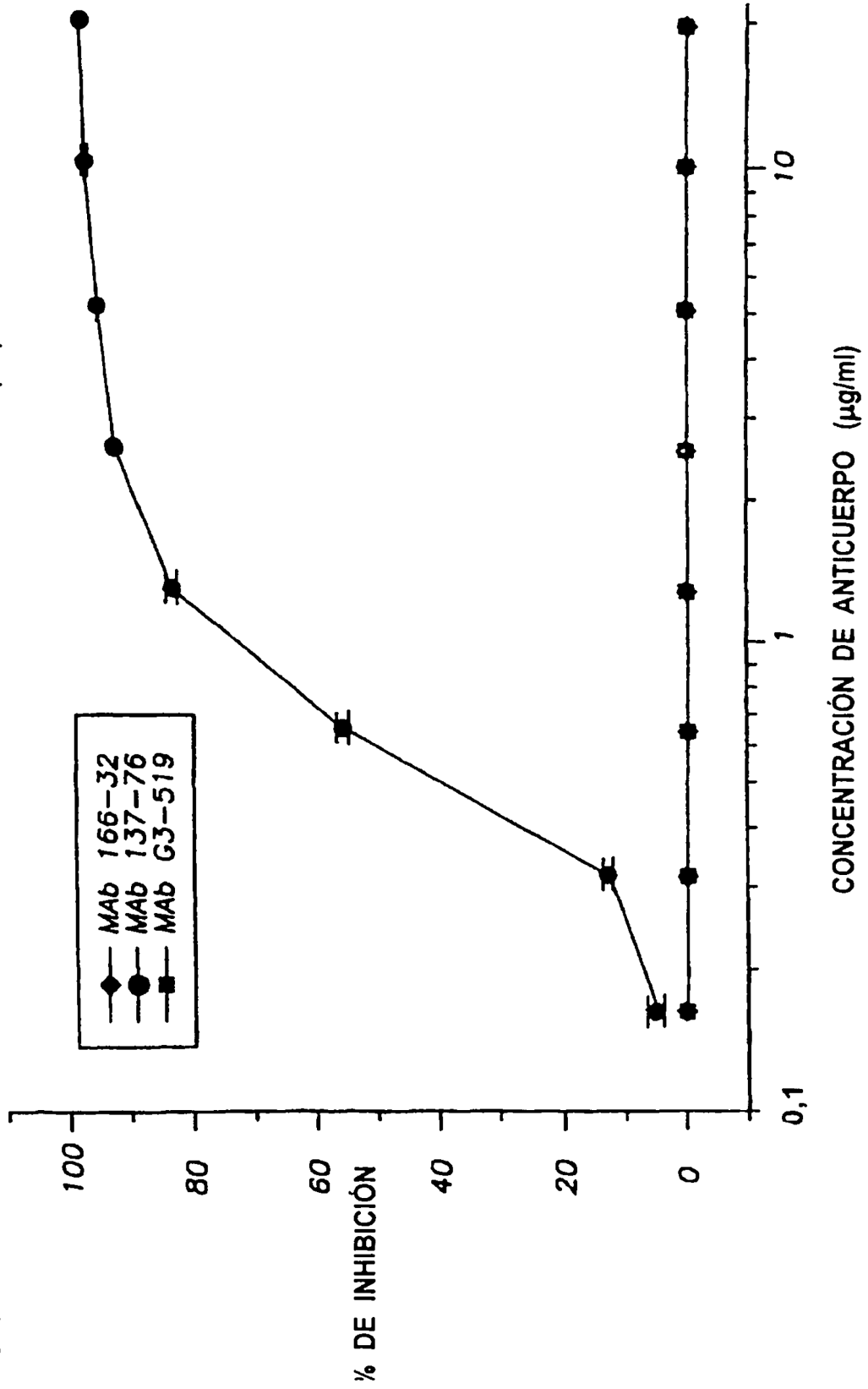
INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP) POR ACCIÓN DEL ANTICUERPO 166-32 ANTI-FACTOR D





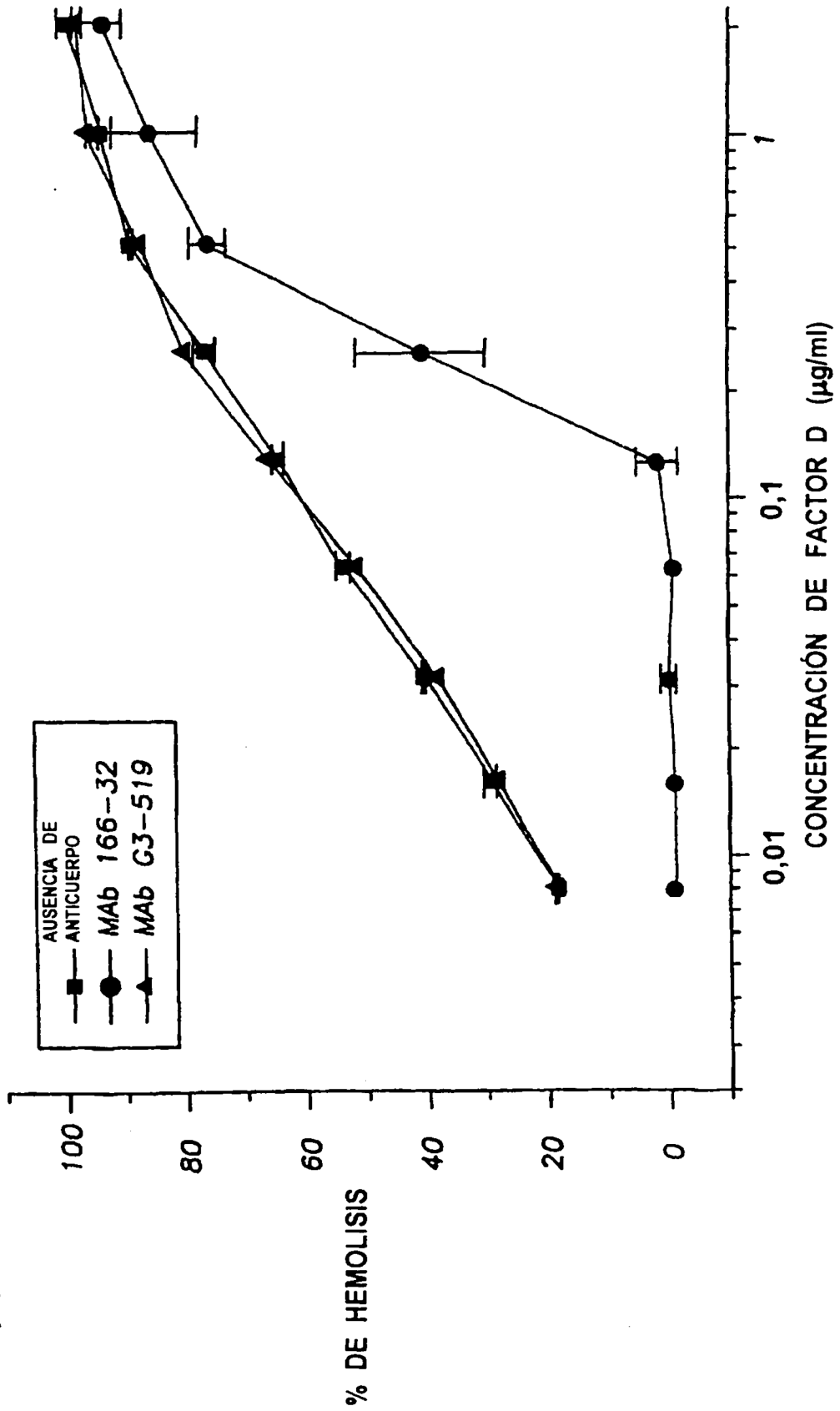
EFFECTO DEL MAb 166-32 ANTI-FACTOR D SOBRE LA HEMOLISIS
POR LA RUTA CLASICA (CP)

FIG.4



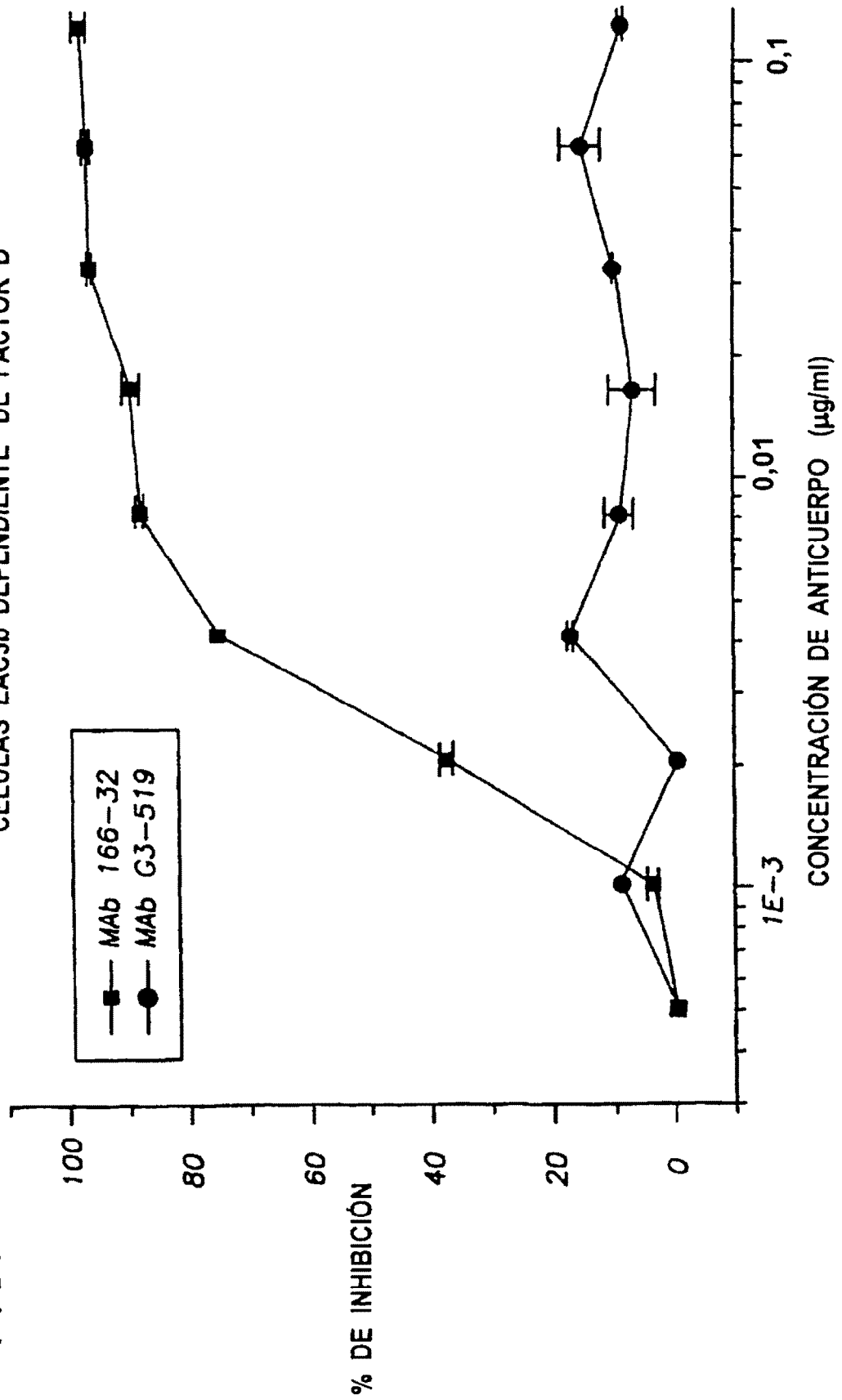
INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP)
DEPENDIENTE DE FACTOR D, POR ACCIÓN DEL MAb 166-32

FIG.5



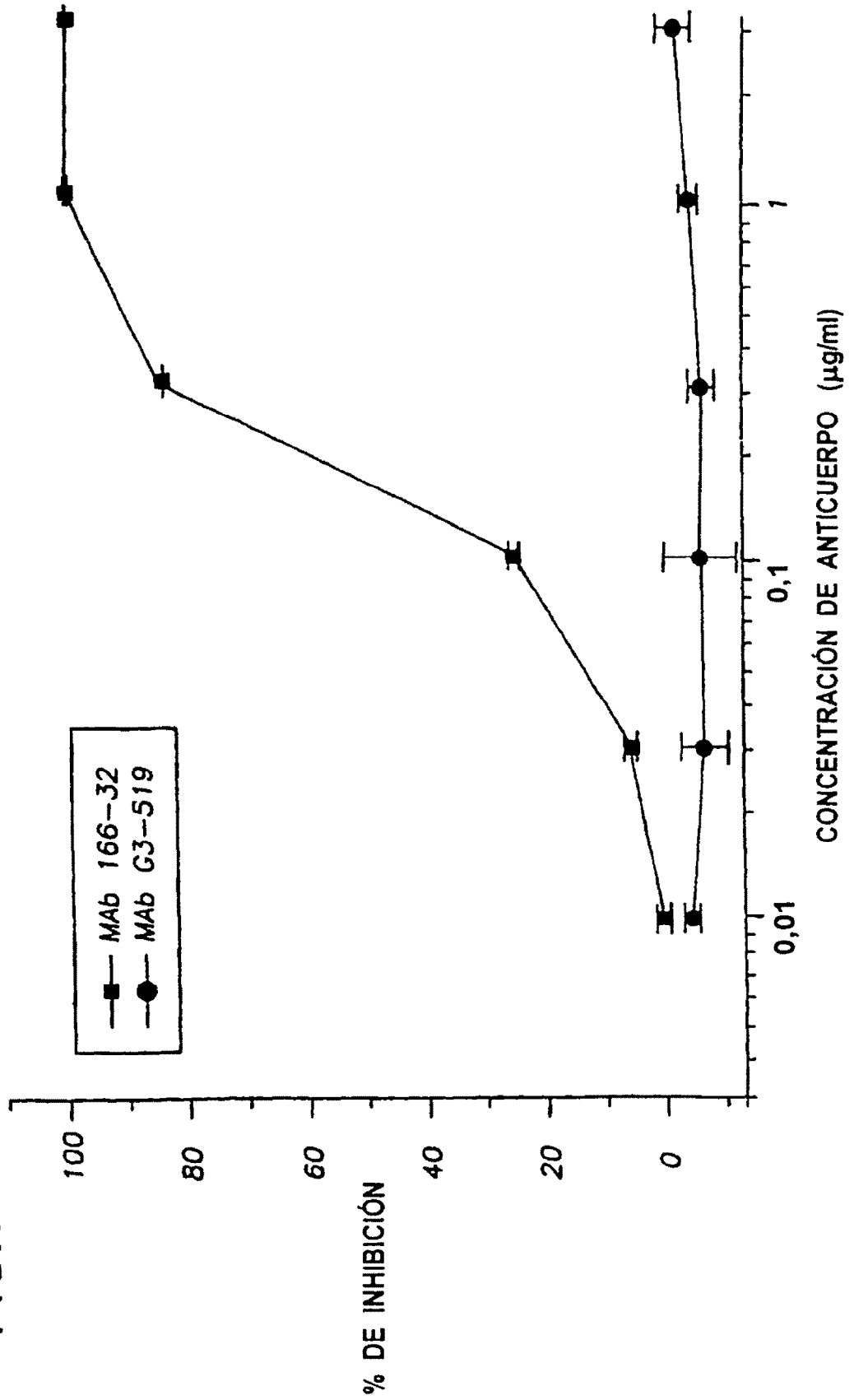
EFFECTO DEL MAb 166-32 ANTI-FACTOR D SOBRE LA LISIS DE
CÉLULAS EAC3b DEPENDIENTE DE FACTOR D

FIG. 6



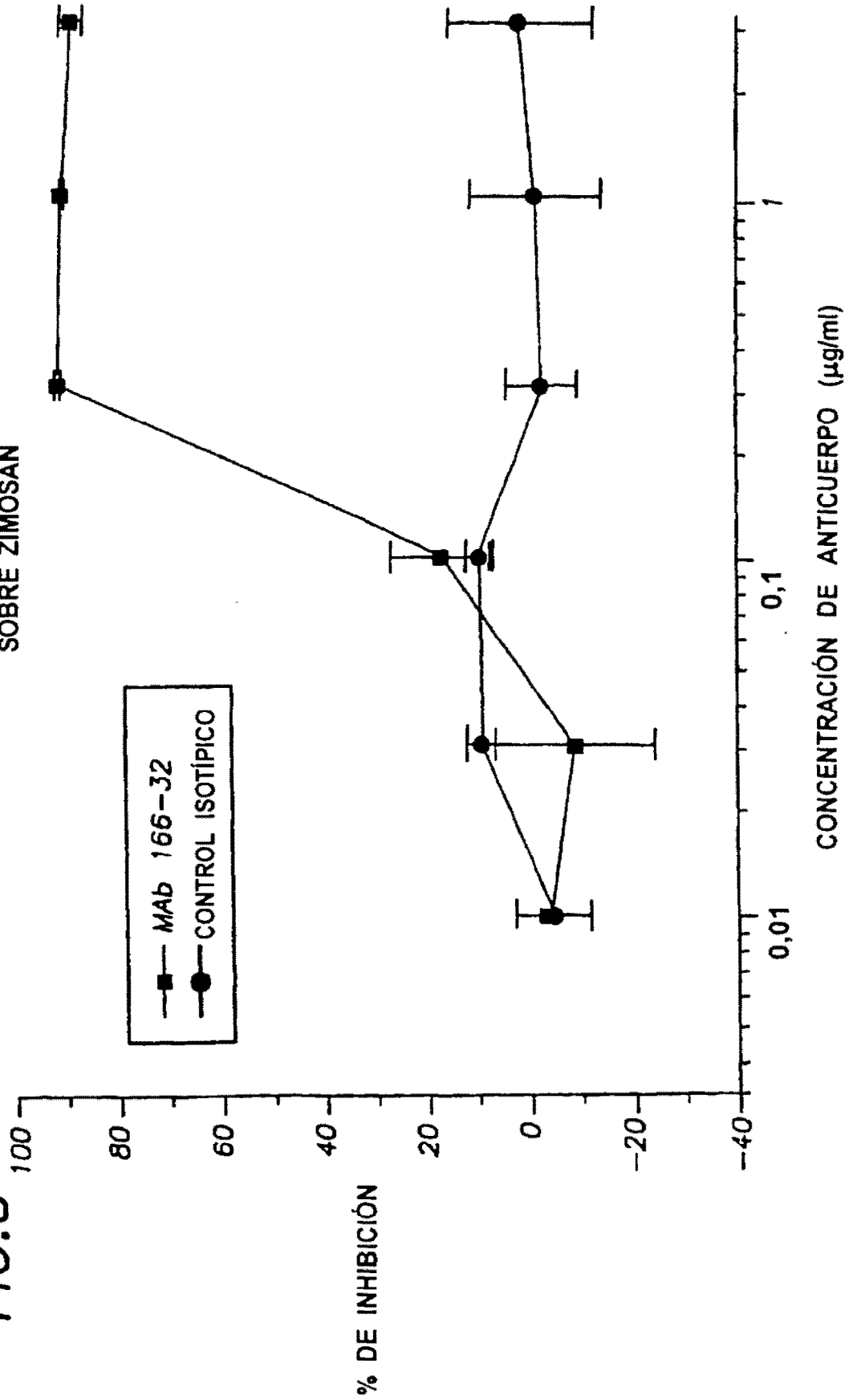
EFFECTO DEL MAb 166-32 EN LA PRODUCCIÓN DE C3a A TRAVÉS DE LA
ACTIVACIÓN DE LA RUTA ALTERNATIVA (AP) DEL COMPLEMENTO
SOBRE ZIMOSÁN

FIG:7



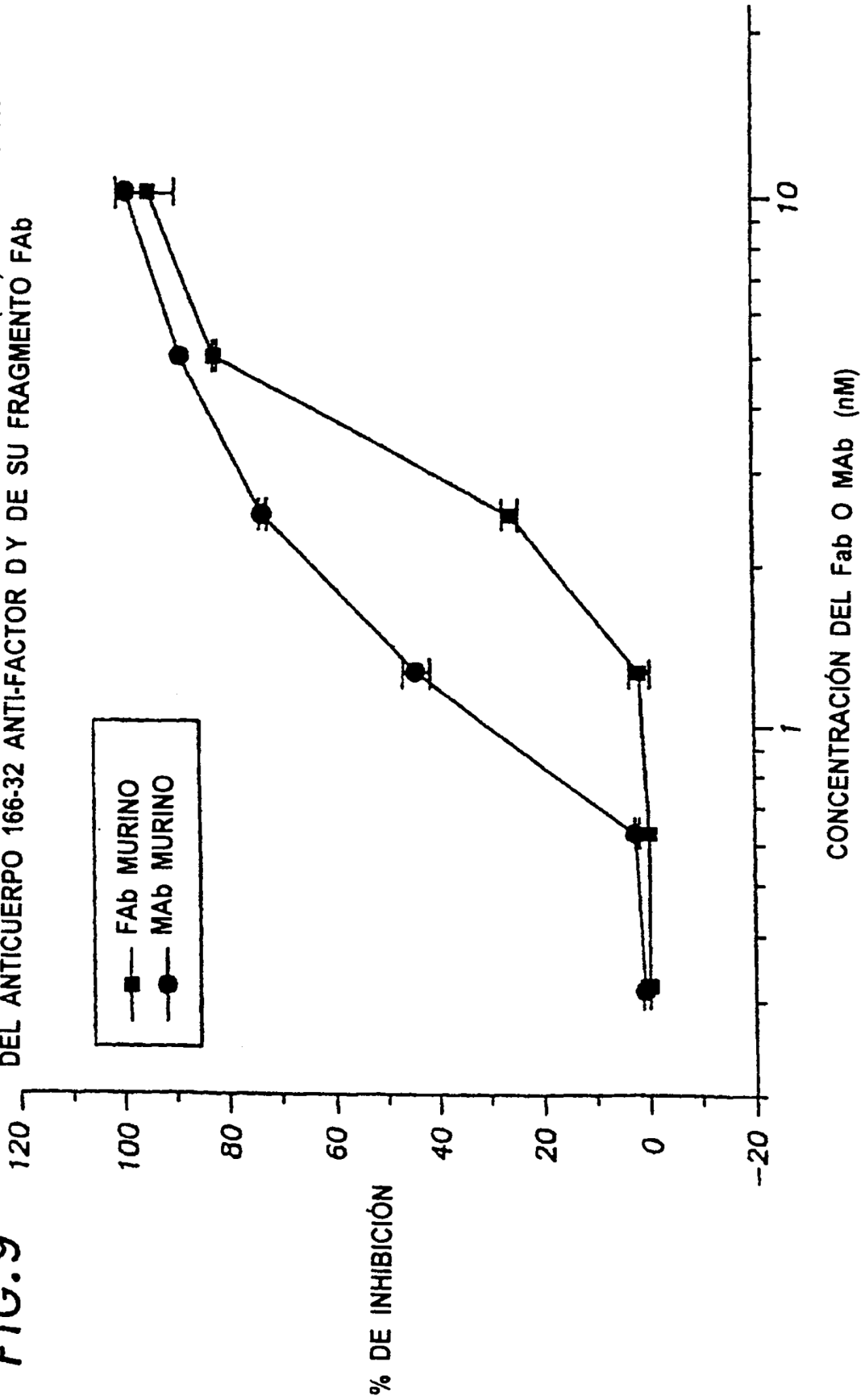
EFFECTO DEL MAb 166-32 EN LA PRODUCCIÓN DE sC5b-9 A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA ALTERNATIVA (AP) DEL COMPLEMENTO SOBRE ZIMOSÁN

FIG.8



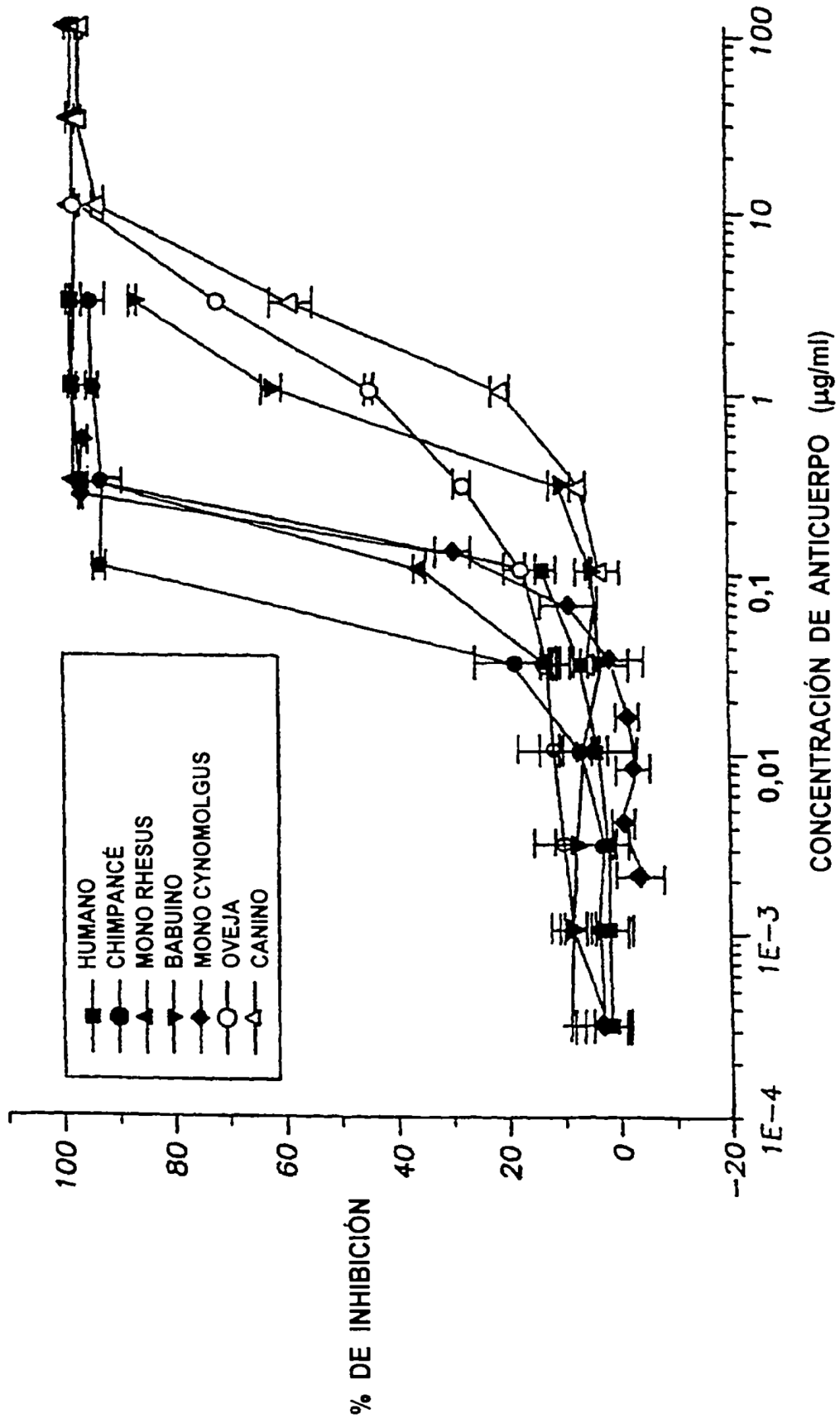
INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP) POR ACCIÓN DEL ANTICUERPO 166-32 ANTI-FACTOR D Y DE SU FRAGMENTO Fab

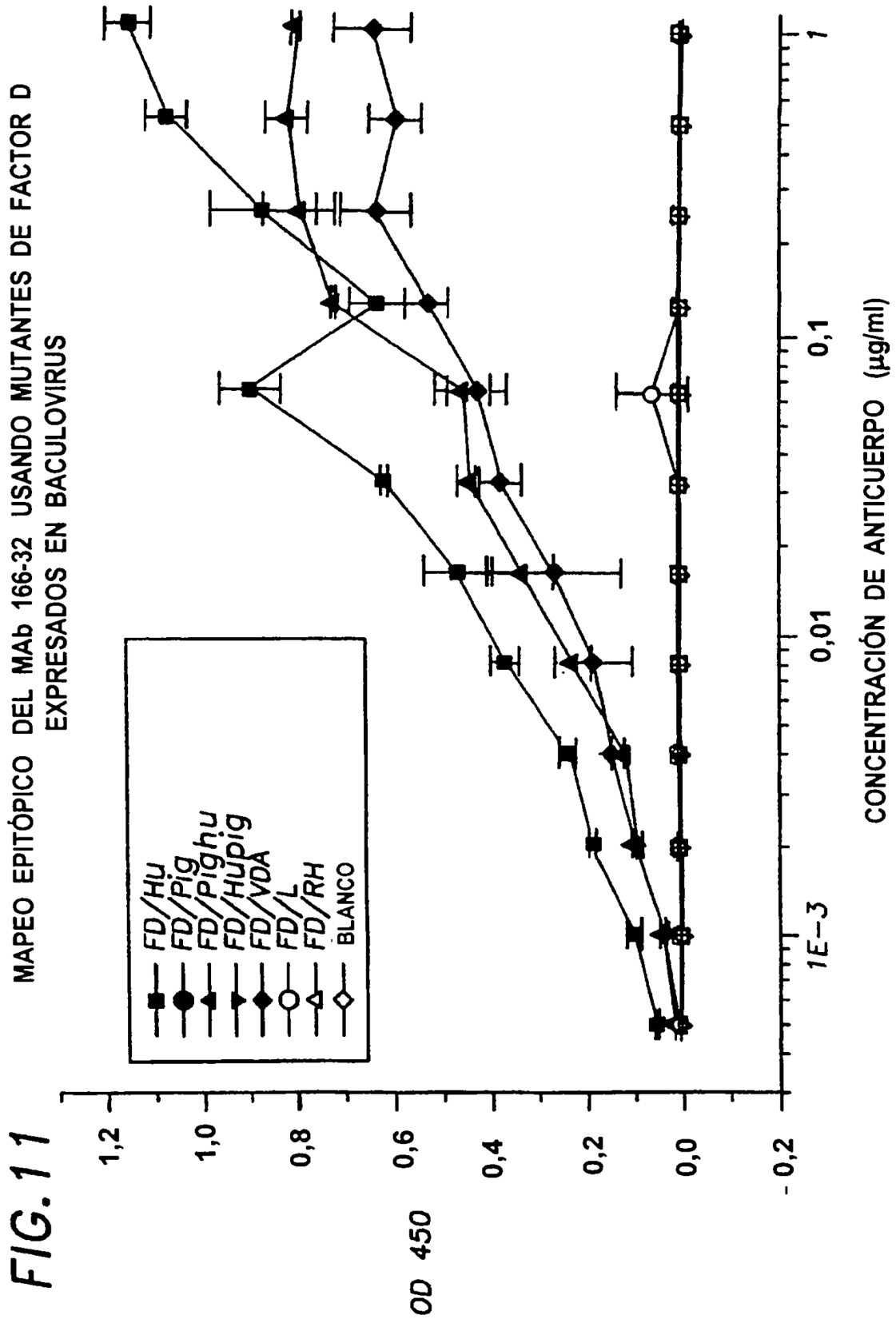
FIG.9



INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP) POR ACCIÓN DEL Mab 166-32 ANTI-FACTOR D HUMANO

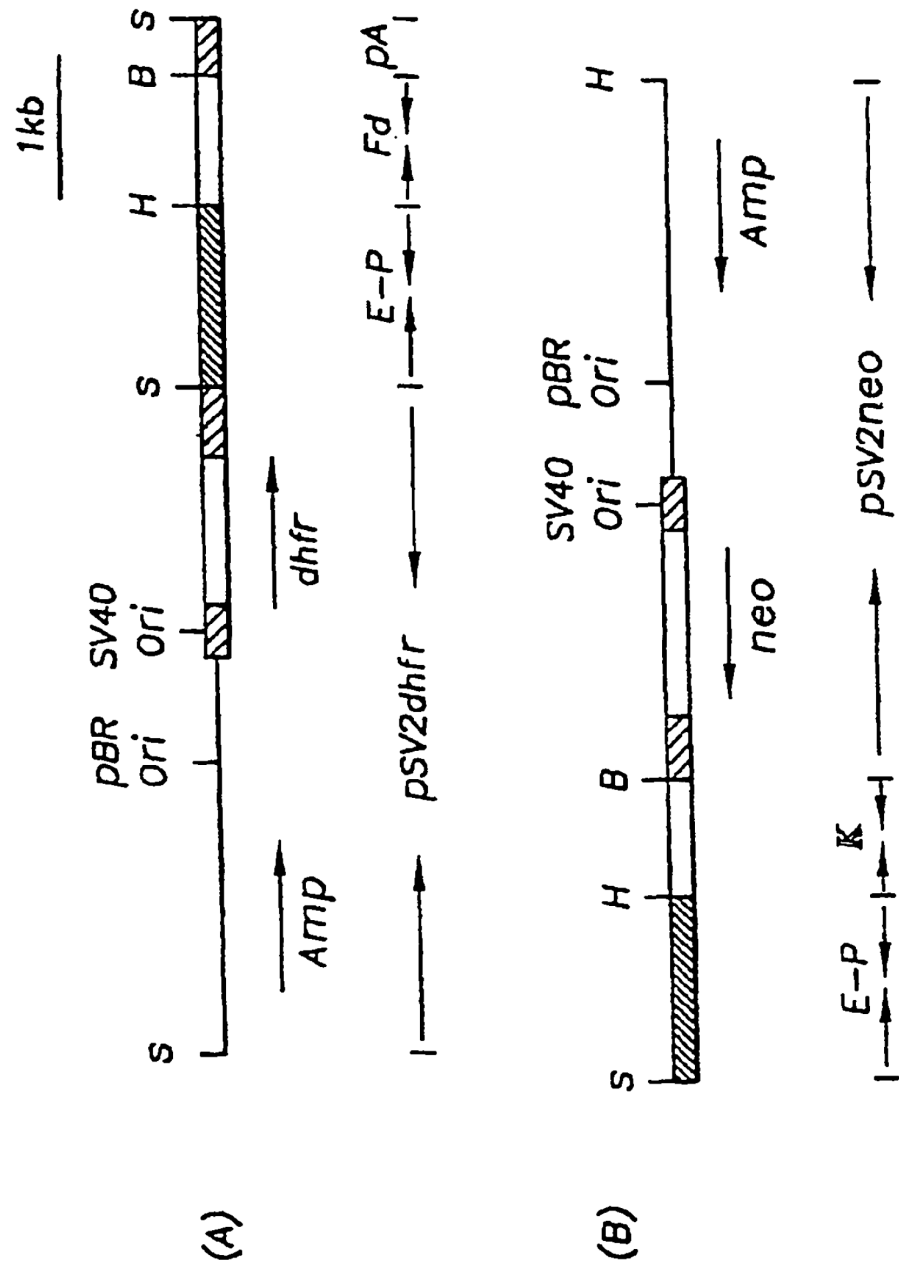
FIG. 10





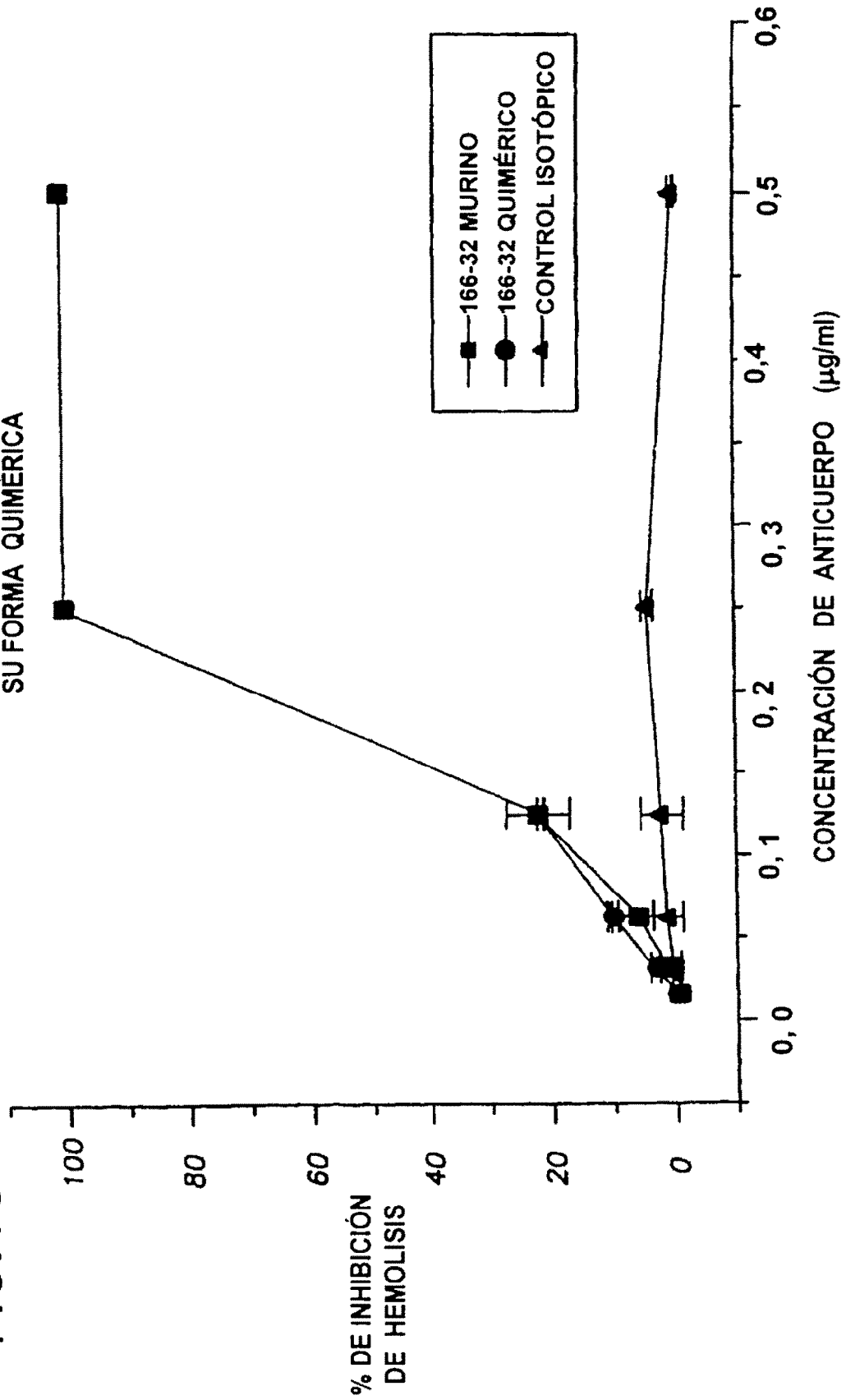
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PLÁSMIDOS VECTORES DE EXPRESIÓN DEL
 Fab 166-32 QUIMÉRICO: (A) pSV2dhfrFd Y (B) pSV2neoK

FIG. 12



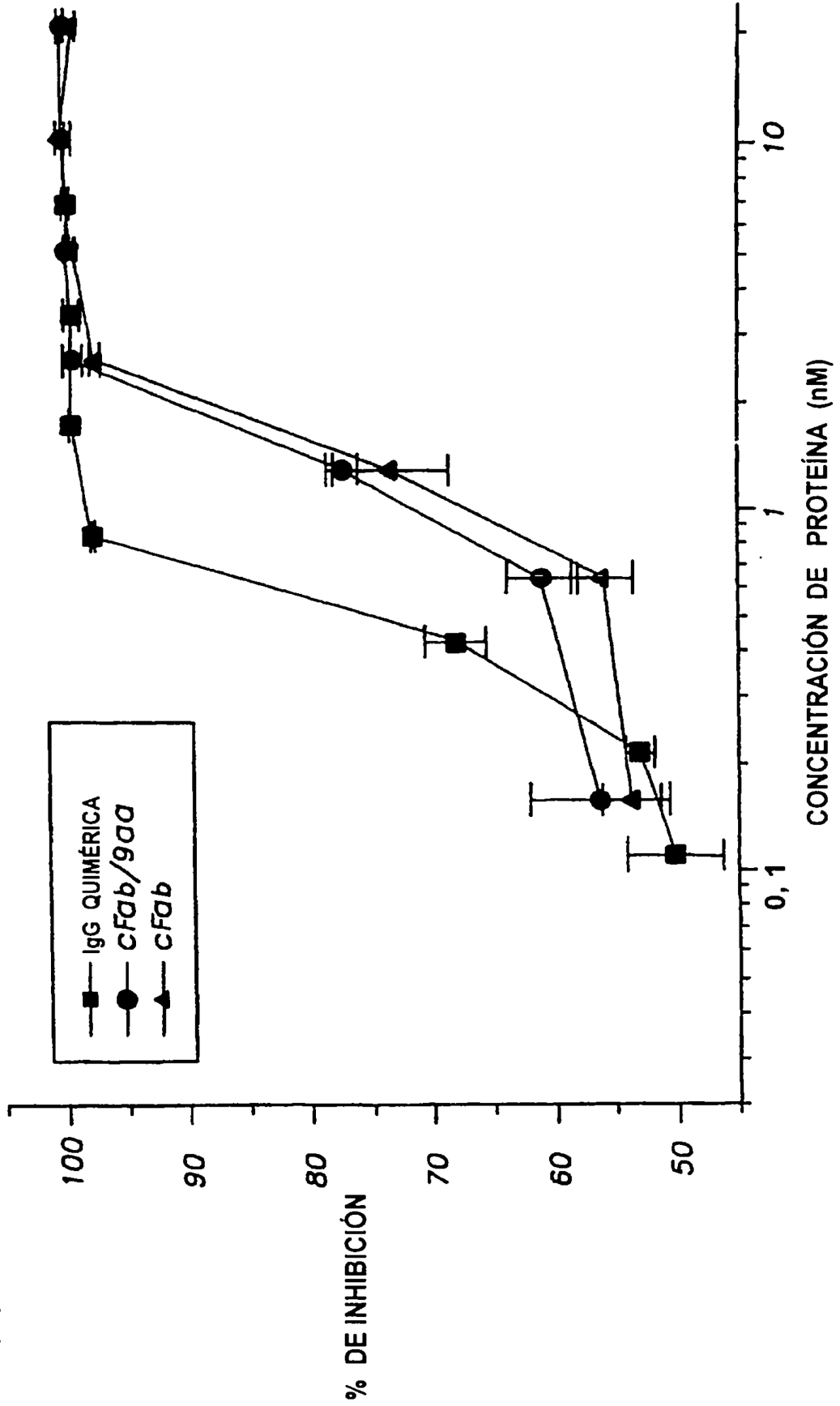
INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP)
 POR ACCIÓN DEL ANTICUERPO 166-32 ANTI-FACTOR D Y DE
 SU FORMA QUIMÉRICA

FIG. 13



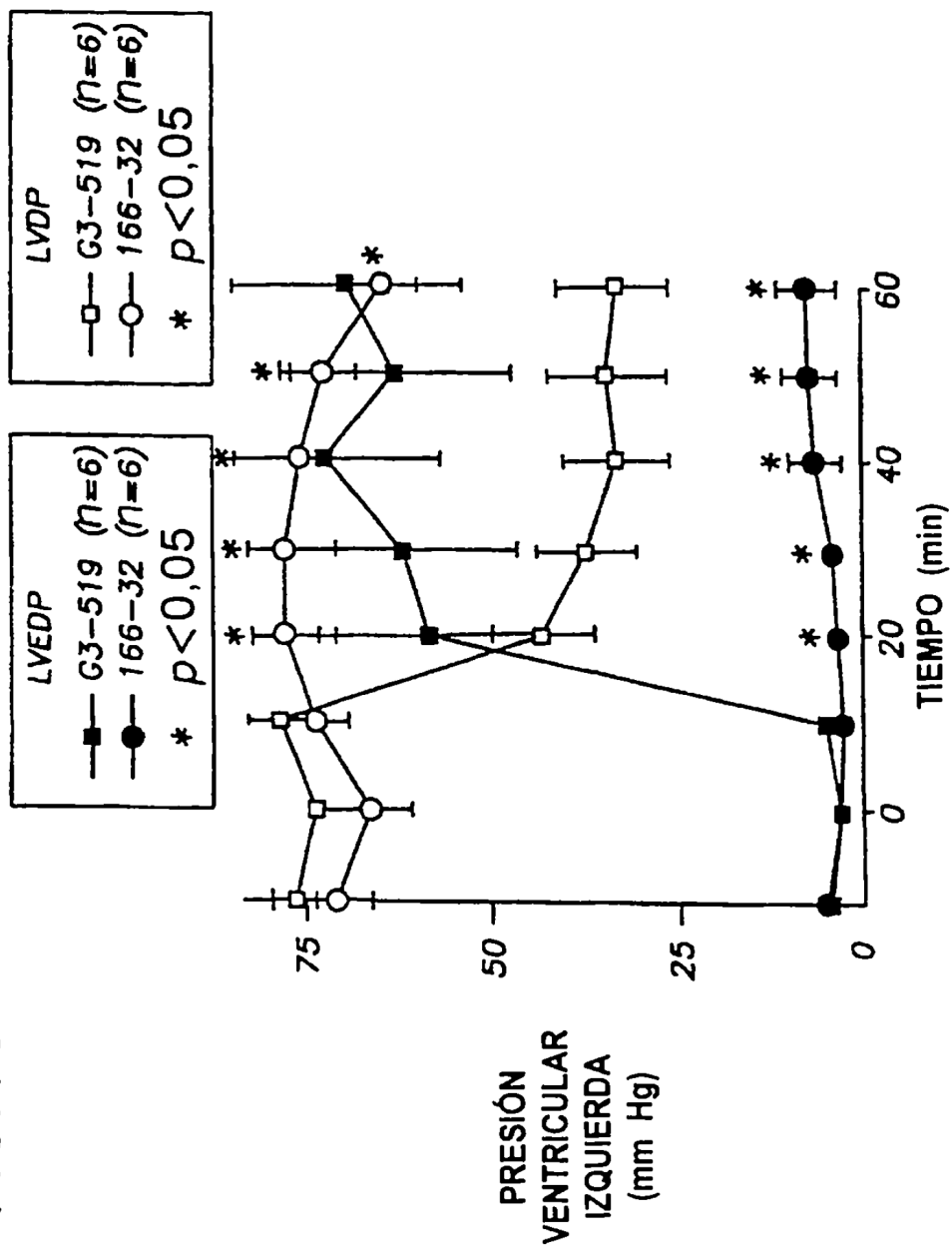
INHIBICIÓN DE LA HEMOLISIS POR LA RUTA ALTERNATIVA (AP)
POR ACCIÓN DE LA IgG 166-32 QUIMÉRICA Y DE SU Fab

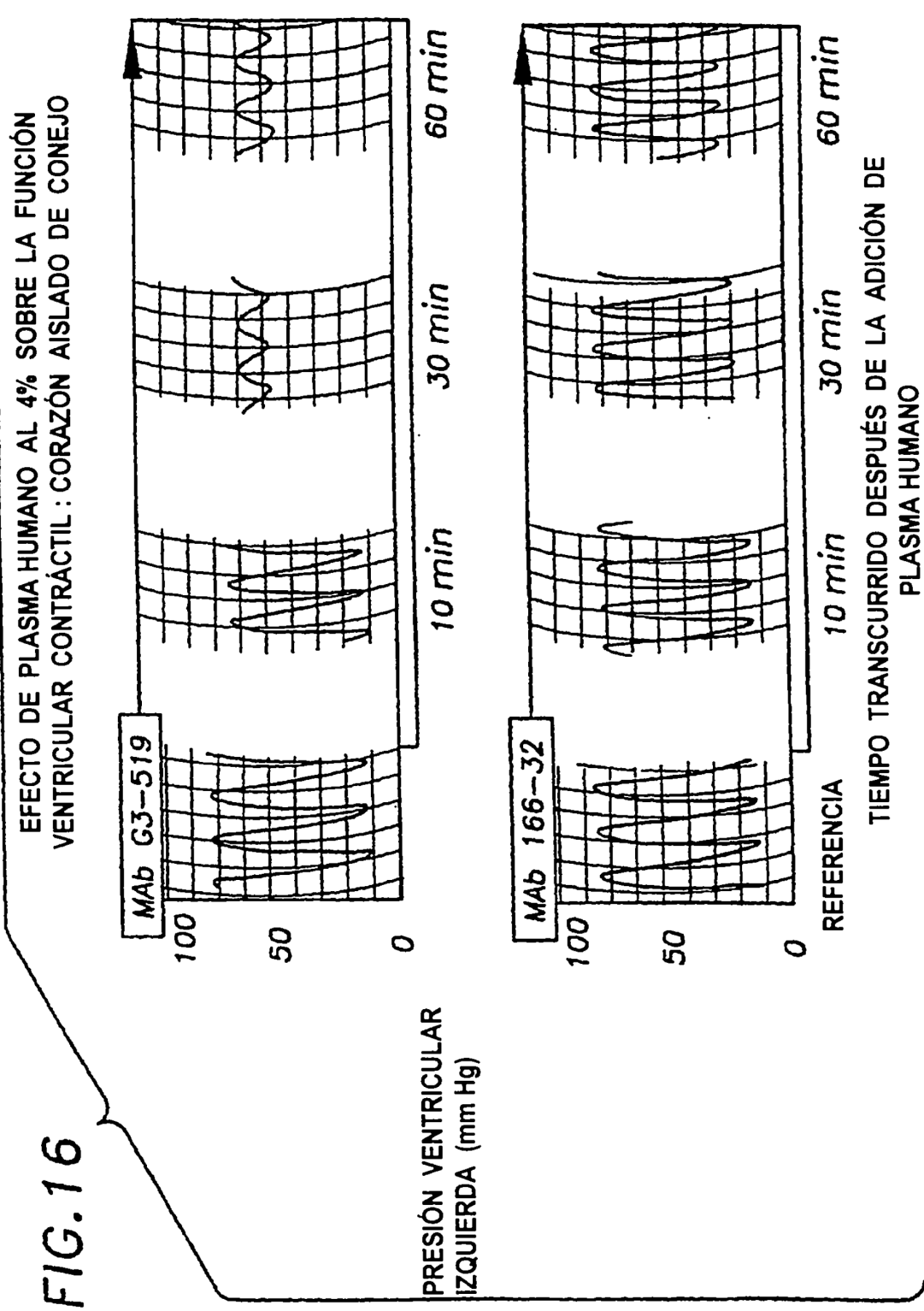
FIG. 14



EFFECTOS DEL 166-32 SOBRE LAS LVEDP Y LVDP DE CORAZONES AISLADOS DE CONEJO Y PERFUNDIDOS CON PLASMA HUMANO

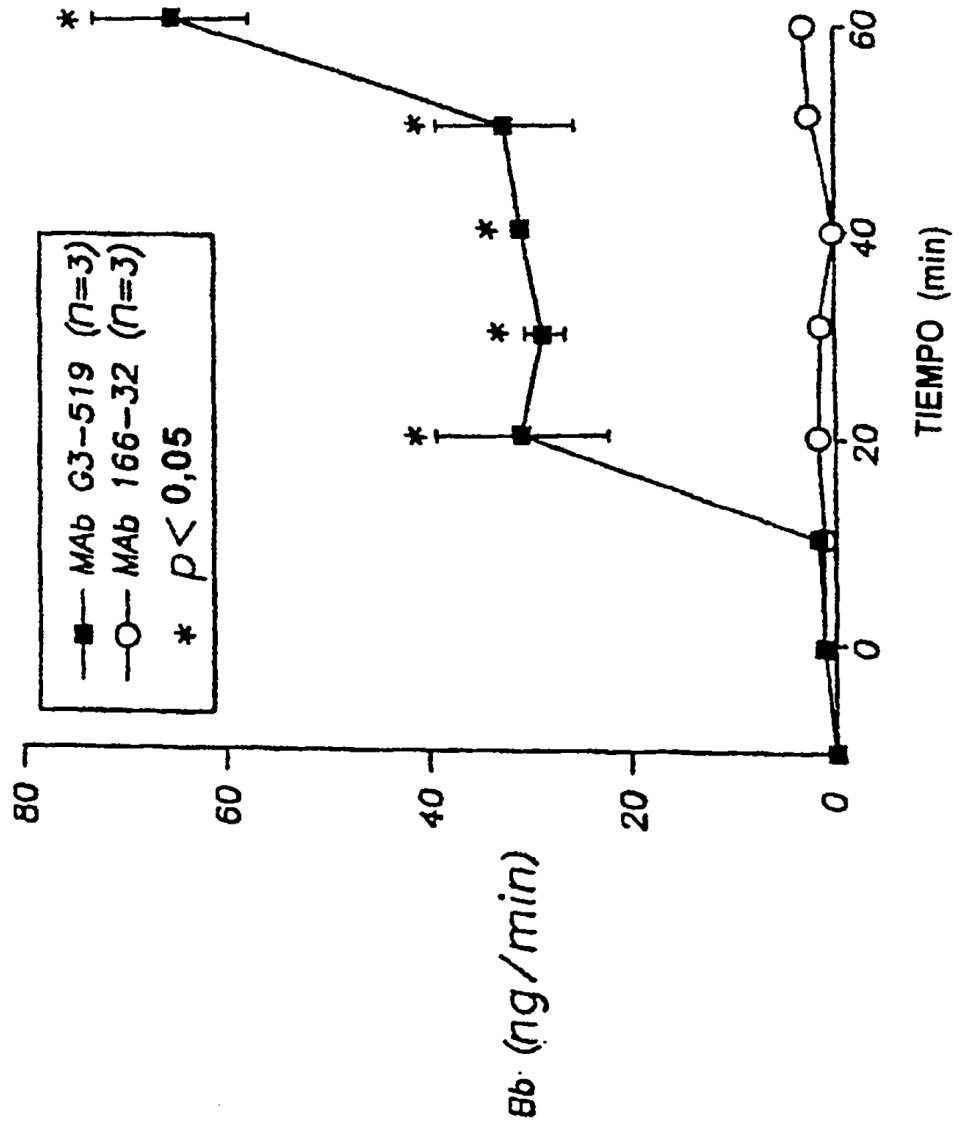
FIG. 15





EFFECTOS DEL MAb 166-32 SOBRE LOS NIVELES DE Bb EN
 LINFA CARDÍACA DE CORAZONES DE CONEJO AISLADOS Y
 PERFUNDIDOS CON PLASMA HUMANO

FIG. 17



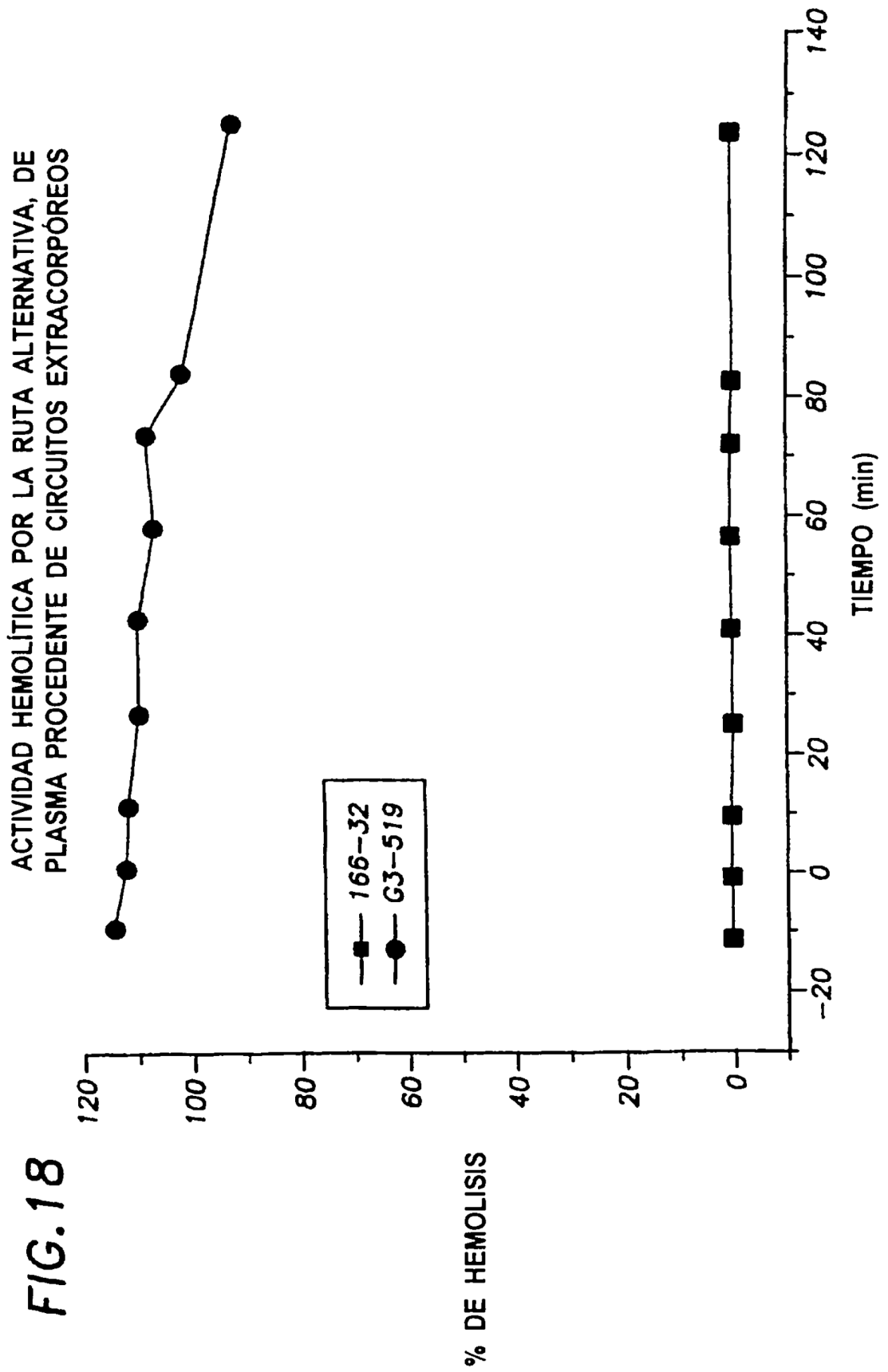
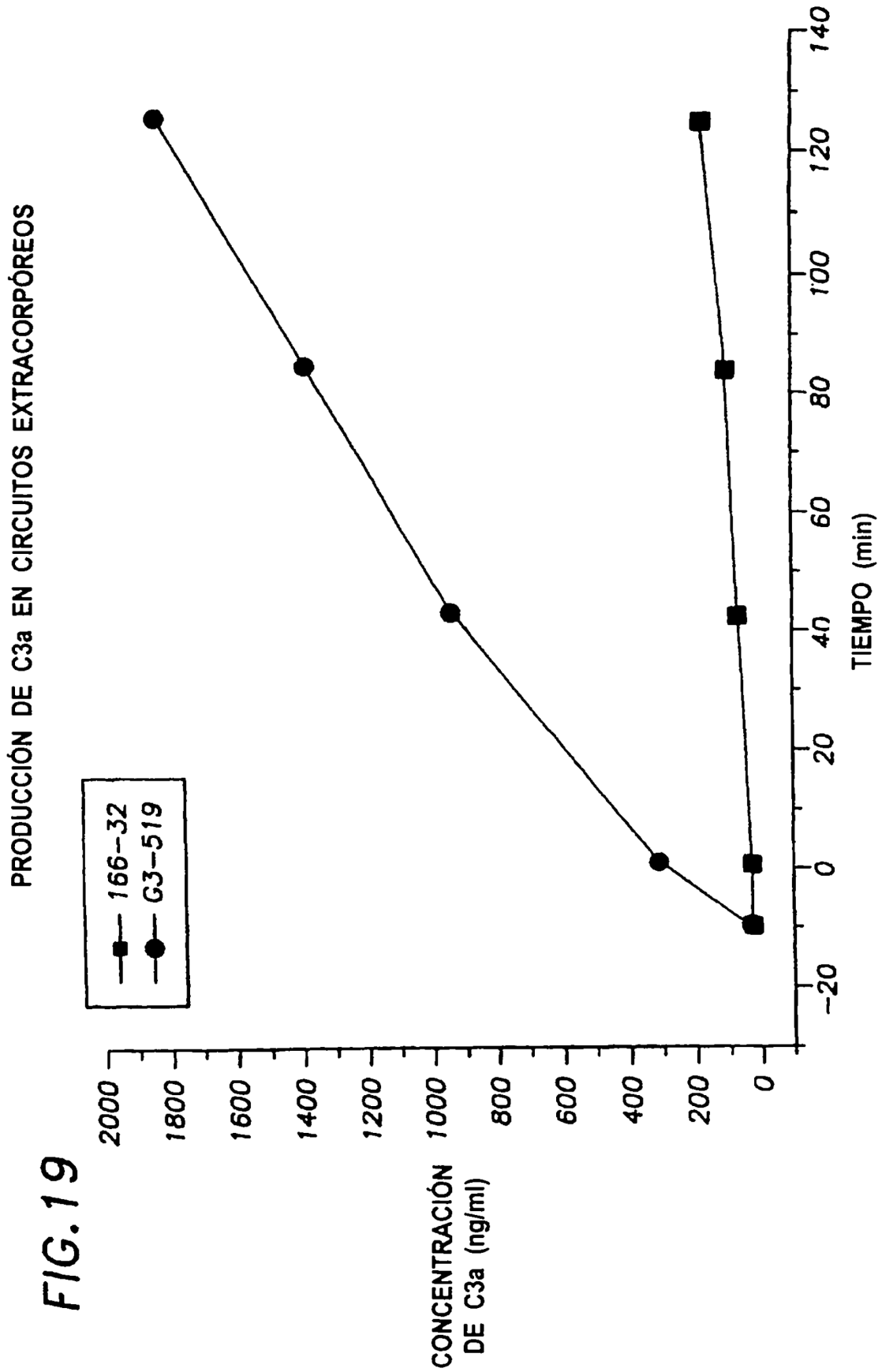


FIG.18



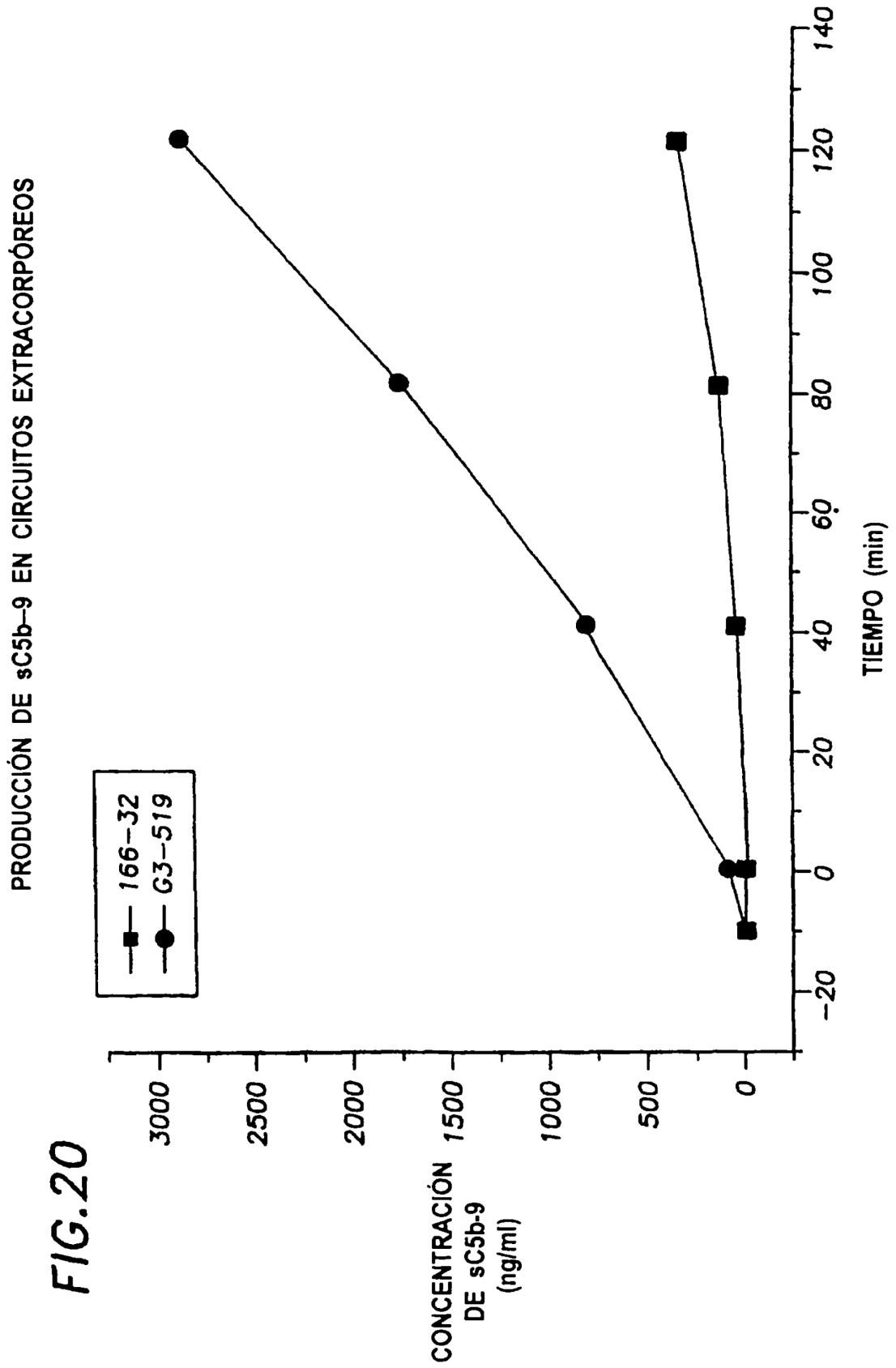


FIG. 20

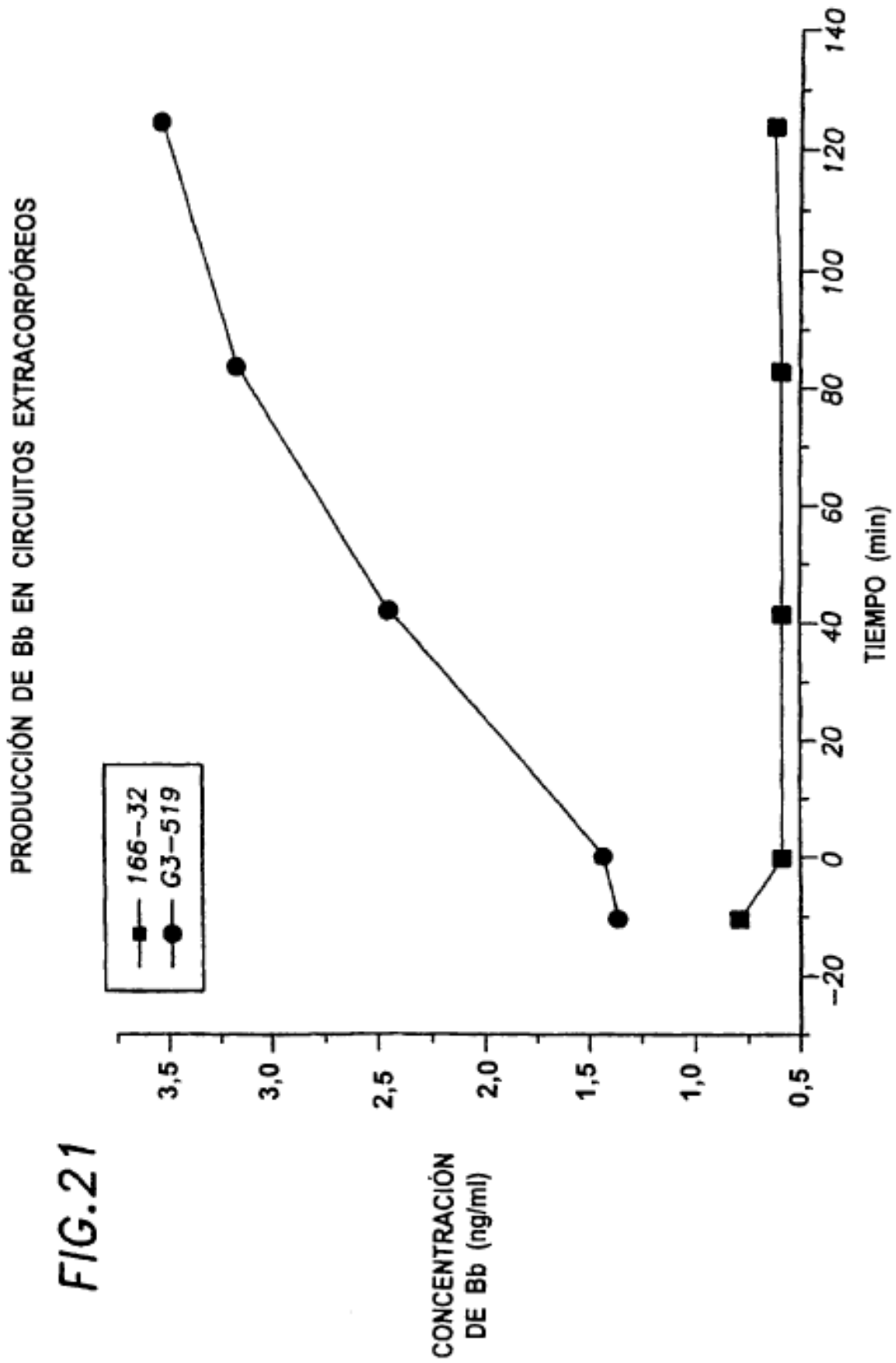


FIG.21

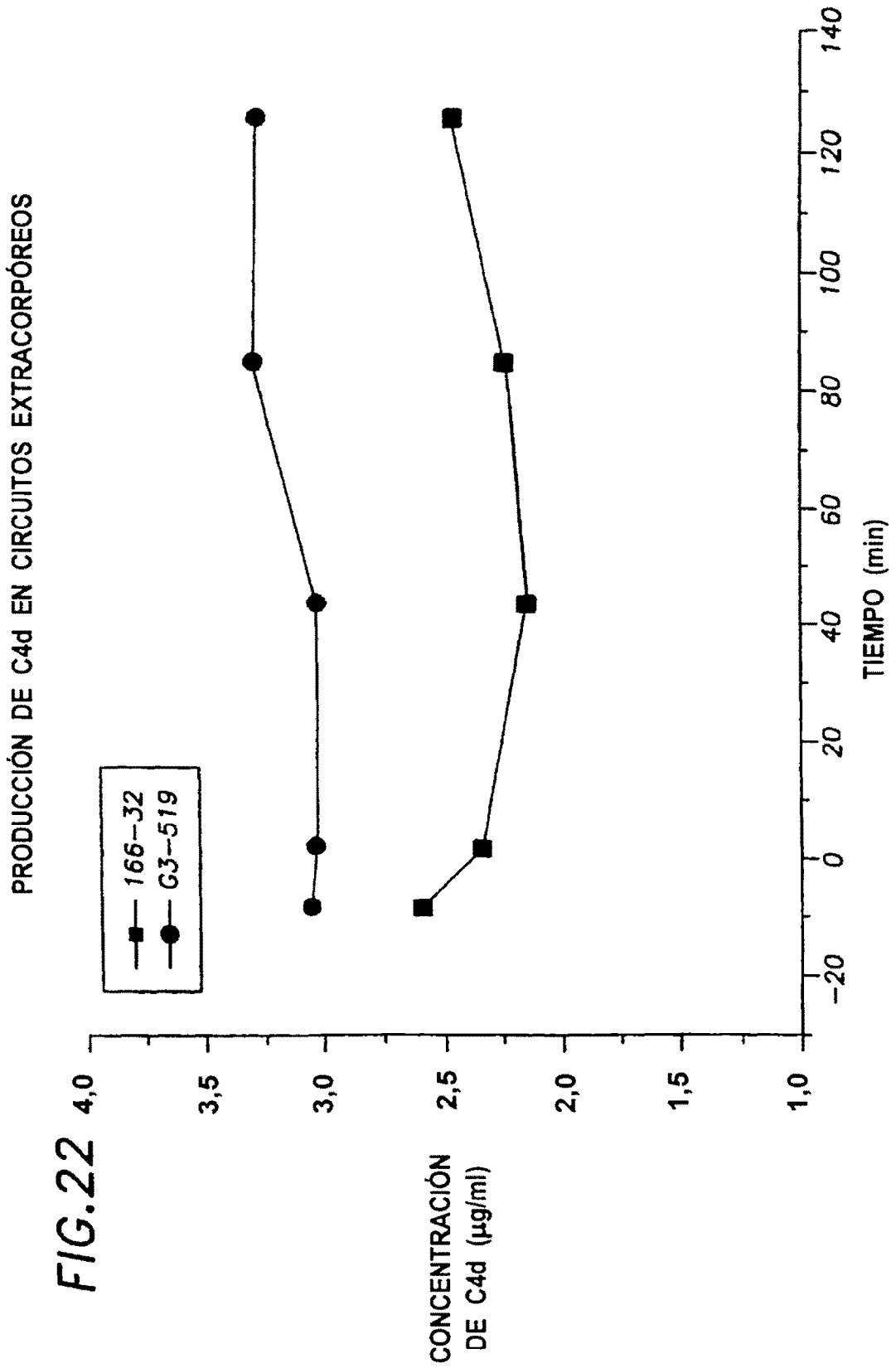
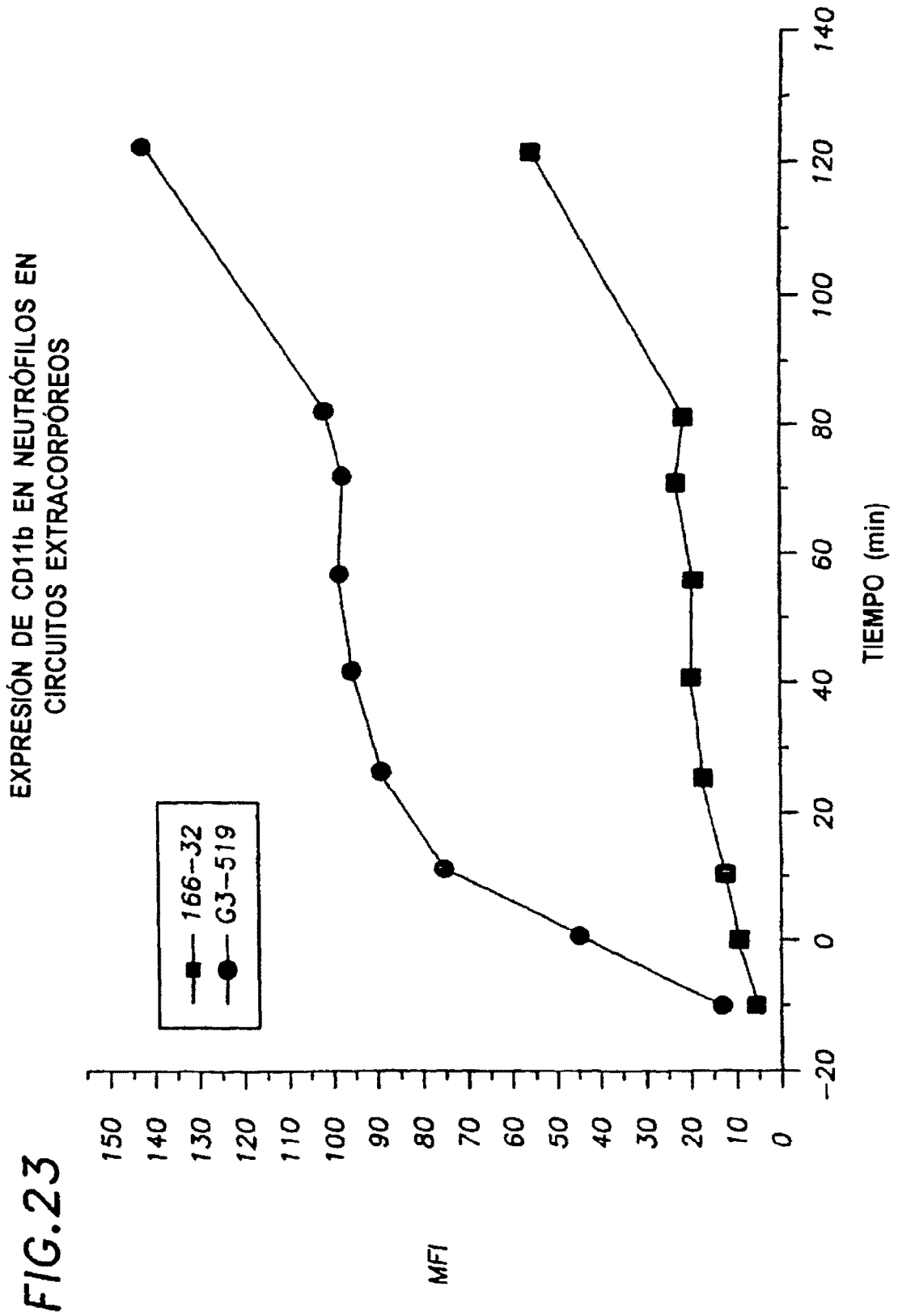


FIG.22



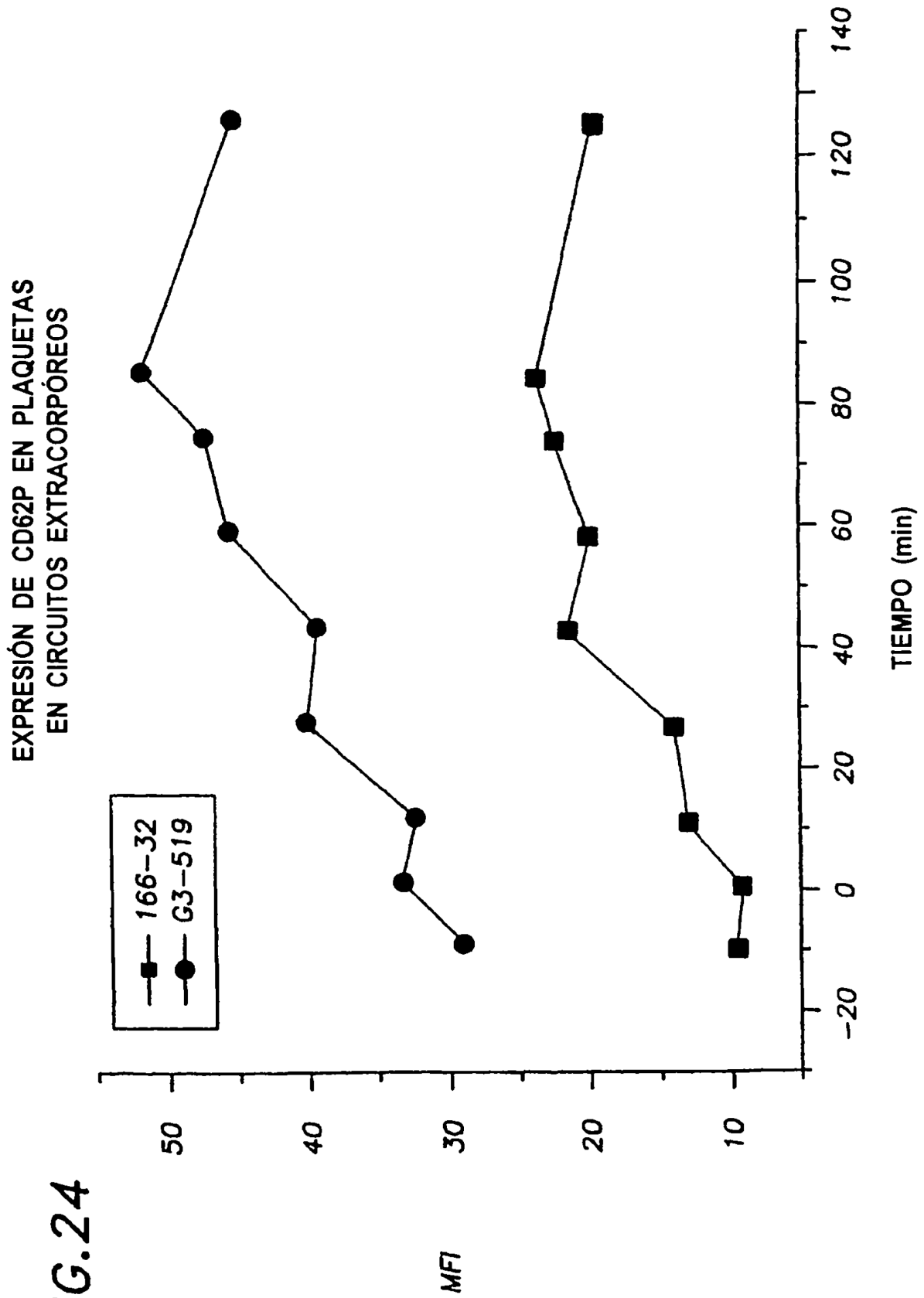


FIG.24

NIVEL DE LA MIELOPEROXIDASA EN CIRCUITOS EXTRACORPÓREOS

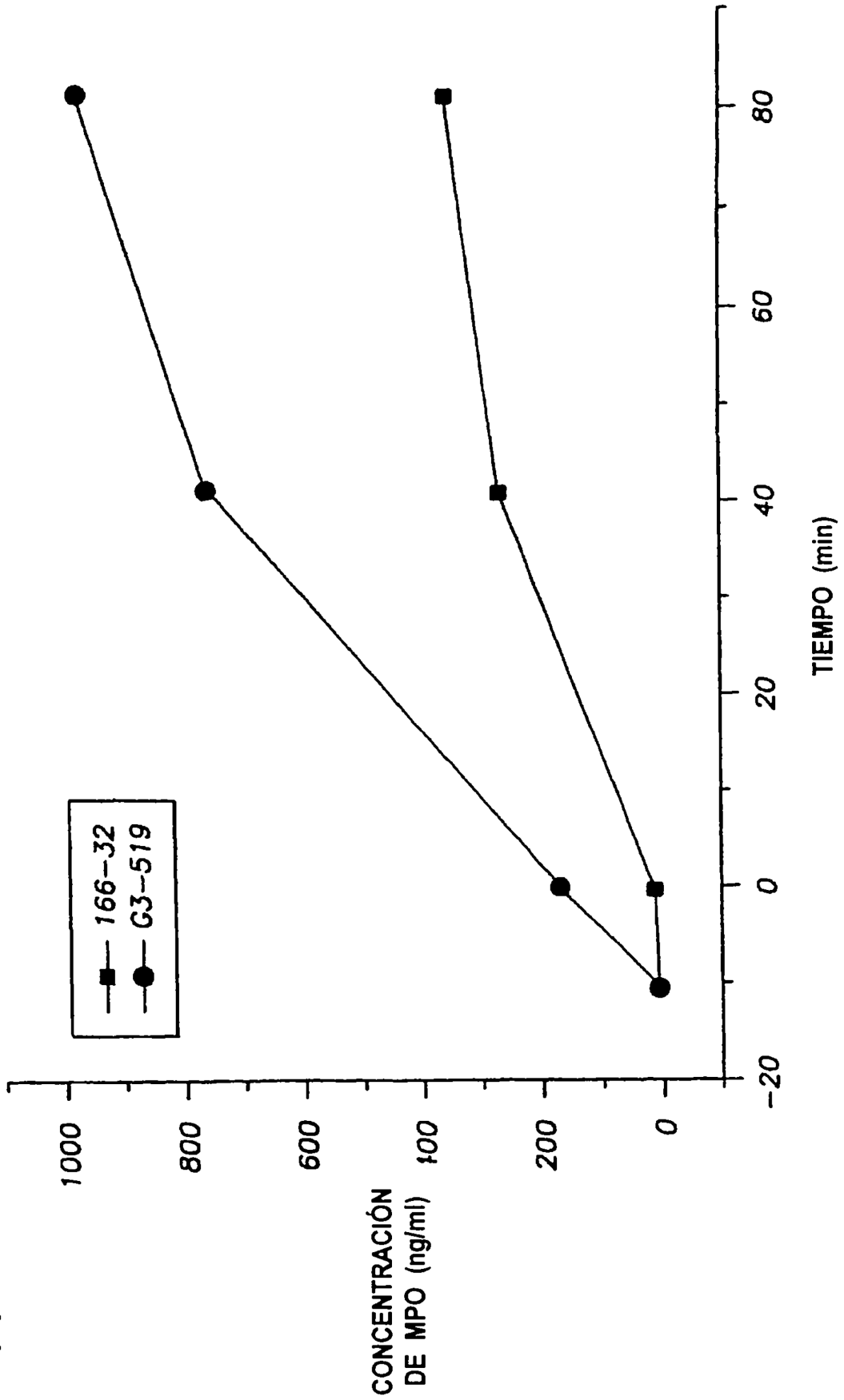


FIG.25