

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 114**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2008 E 08772137 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2262831**

54 Título: **Anticuerpos anti-properdina**

30 Prioridad:

03.03.2008 US 33127 P

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

17.06.2015

73 Titular/es:

**NOVELMED THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
11000 Cedar Avenue
Cleveland, OH 44106, US**

72 Inventor/es:

BANSAL, REKHA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 538 114 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

Anticuerpos anti-properdina

CAMPO DE LA INVENCÓN

5 La presente invención se refiere a anticuerpos específicos para properdina y al uso de tales anticuerpos para inhibir la función de la vía alternativa del complemento en un mamífero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCÓN

10 El sistema del complemento es el responsable de iniciar y amplificar la respuesta inflamatoria a la infección microbiana y otras lesiones agudas. Una activación inapropiada del complemento ha sido implicada en situaciones patológicas. Por ejemplo, el sistema del complemento ha sido implicado en la contribución a la patogénesis de varias afecciones agudas y crónicas, incluyendo la aterosclerosis, isquemia-reperusión después de un infarto de miocardio agudo, nefritis púrpura de Henoch Schonlein, vasculitis compleja inmune, artritis reumatoide, arteritis, aneurisma, accidente cerebrovascular, cardiomiopatía, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, insuficiencia orgánica múltiple, choque hipovolémico e isquemia intestinal, rechazo de trasplantes, cirugía cardíaca, PTCA, aborto espontáneo, lesión neuronal, lesión de la médula espinal, miastenia grave, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión, lesión pulmonar aguda, enfermedad de Goodpasture, infarto de miocardio, inflamación de baipás post-cardiopulmonar, baipás cardiopulmonar, choque séptico, rechazo de trasplantes, xenotrasplante, lesiones por quemaduras, lupus eritematoso sistémico, nefritis membranosa, enfermedad de Berger, psoriasis, penfigoide, dermatomiositis, síndrome anti-fosfolípido, enfermedad inflamatoria del intestino, hemodiálisis, leucoféresis, plasmaféresis, precipitación LDL de oxigenación de la membrana extracorpórea inducida por heparina, oxigenación por membrana extracorpórea y degeneración macular.

25 El complemento se puede activar a través de tres cascadas enzimáticas distintas, a las que se alude como la "clásica", "lectina/MBL" y vías "alternativas" (CP, MBL, y AP, respectivamente). Estas vías se muestran esquemáticamente en la Fig. 1. La CP generalmente se desencadena por anticuerpos unidos a un patógeno extraño. Por lo tanto, esta vía requiere una exposición previa a ese patógeno para la generación de anticuerpos específicos. Existen tres proteínas plasmáticas implicadas específicamente en el CP: C1, C2 y C4. MBL es una variación de CP, y se activa por la presencia de lectina/MASP-2, pero la cascada es similar a la CP.

30 En contraposición con la CP y MBL, la AP se desencadena espontáneamente por superficies extrañas (p. ej., bacterias, levaduras, tejido dañado) u otras superficies anormales tales como las superficies artificiales de dispositivos médicos (p. ej., la superficie de una máquina en donde se hace circular la sangre). Existen tres proteínas plasmáticas específicas para AP: factores B, D y P (properdina). Las tres vías convergen en C3 y comparten proteínas C3 a C5-9 que están implicadas en las últimas etapas de las cascadas de activación. Anafilotoxinas C3a y C5a se producen a causa de la activación del complemento. El complejo del complemento terminal, conocido como C5b-9, también conocido como el complejo de ataque a la membrana (MAC), es el producto terminal de la vía.

40 La Fig. 2 ilustra un esquema de activación de AP. Como resultado de una activación al ralentí de C3, se genera C3b. En el esquema, se ha supuesto que se ha realizado esa activación al ralentí de C3 y la escisión de C3 genera la misma C3b activada con la C3a liberada. La C3b activada une oligómeros de properdina presentes en la sangre al complejo (P)_n(C3b)_n generado. Factor B que tiene mayor afinidad a C3b unida a properdina produce el complejo PC3bB, que luego es escindido por el factor D para generar PC3bBb. Esta convertasa activa escinde C3 adicional para producir C3b y liberar C3a. La misma convertasa C3 con moléculas C3b adicionales forma la convertasa C5. La convertasa C5 o la convertasa C3 escinde C5 para producir C5b y C5a. La molécula de C5b se inserta en la bicapa lipídica y forma el núcleo para la deposición de MAC.

45 Es bien aceptado que la vía alternativa sirve como el bucle de amplificación de las tres vías. Para bloquear la función de bucle de amplificación, se han desarrollado y testado los anticuerpos para las tres proteínas específicas para AP. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales de factor P que inhiben ambas vías del complemento. También se han desarrollado anticuerpos anti-factor B y D. Aunque se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-properdina, estos anticuerpos monoclonales inhiben tanto la vía clásica como la vía alternativa (patente de EE.UU. nº 6.333.034).

Los anticuerpos policlonales desarrollados contra TSR5 demuestran que TSR5 está implicado en la unión de C3b y la activación de AP (Perdikoulis, M.V., U. Kishore y K.B. Reid, *Expression and characterisation of the*

thrombospondin type I repeats of human properdin, Biochim Biophys Acta, 2001. 1548 (2): págs. 265-77). Mientras que la inhibición de la unión de P y la hemólisis AP era sólo del 40-50%, estos autores sugirieron que TSR5 es importante para la función de properdina. Como comparación, los anticuerpos policlonales contra TSR1 y TSR2 demostraron una falta de inhibición en ambos ensayos. Esta publicación enseña que TSR1 y TSR2 son funcionalmente no activos.

Un estudio más reciente enseña que se requiere la inhibición total de la unión de properdina a C3b para la inhibición de la C3a, C5a y MAC (patente de EE.UU. nº 6.333.034). Esta invención enseña que dichos anticuerpos inhiben la vía clásica del complemento directamente al inhibir la actividad convertasa C3 de la vía clásica. Aunque la patente enseña el uso de la circulación extracorpórea como un sistema modelo con sangre humana entera, estos estudios no enseñan el efecto de anticuerpos monoclonales anti-properdina en la activación de monocitos y plaquetas. Se sabe que los monocitos activados liberan TNF y forman conjugados con plaquetas. La invención no enseña si anticuerpos monoclonales anti-properdina inhibirán la activación de monocitos y plaquetas. Se podría predecir que la inhibición de la formación de anafilotoxina debería tener efectos positivos en la inhibición de la activación celular; sin embargo, es posible que tales anticuerpos activarán las células a través de mecanismos no específicos.

La Solicitud de Patente Publicada de EE.UU. Nº 2006/0093599 enseña que la inhibición de la unión de properdina a C3b no es esencial para la inhibición de la formación de C3b y C5b-9. En la solicitud de patente, se utilizaron anticuerpos monoclonales completamente humanos que inhibían la unión de properdina a C3b e inhibían la producción de C3a, C5a y C5b-9 en sangre entera. Por desgracia, estos anticuerpos monoclonales completamente humanos activaban plaquetas, causaron la formación de agregados de plaquetas de leucocitos y agregaron monómeros de properdina formando estructuras oligoméricas superiores haciendo a estos anticuerpos inútiles para aplicaciones terapéuticas. La solicitud de patente no proporciona evidencia / datos algunos que soporten que el anticuerpo monoclonal totalmente humano inhibe la oligomerización del monómero de properdina. Se sabe que la sangre contiene dímeros, trímeros y tetrámeros de properdina. No se han reseñado monómeros. No está claro cómo el monoclonal totalmente humano de la solicitud de patente publicada de EE.UU. Nº. 2006/0093599 previene la oligomerización de monómero de properdina. La invención parece ser hipotética y no fundada en hechos. Además de ello, se observó que el anticuerpo monoclonal de la Solicitud de Patente Publicada de EE.UU. Nº 2006/0093599 potenciaba en realidad la formación de oligómeros, posiblemente explicando la activación de las plaquetas observada en la circulación extracorpórea.

Molecular Immunology 37 (2000) 191-201 describe que se generó un panel de anticuerpos monoclonales y que luego se rastreó en cuanto a la inhibición de la vía alternativa.

El documento WO 03/074726 A2 describe proteínas asociadas a la respuesta inmune humana (IRAP), incluidos anticuerpos, y métodos para tratar trastornos asociados con la expresión aberrante de IRAP.

Compendio de la Invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a SEQ ID NO: 2 y bloquea la activación alternativa de la vía de alternativa sin afectar a la activación de la vía clásica en un mamífero, para uso en un método para mejorar una enfermedad o afección asociada con una activación excesiva o incontrolada del complemento de la vía alternativa en el mamífero.

Preferiblemente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SEQ ID NO: 2 para inhibir la activación del complemento de la vía alternativa en una relación molar de anticuerpo a Factor P de aproximadamente 1:1.

Convenientemente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es para la administración in vivo o ex vivo.

Ventajosamente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es monoclonal.

Preferiblemente dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado, desimmunizado o humano.

Convenientemente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019.

Ventajosamente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo que un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019.

Preferiblemente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las regiones variables murinas de un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019 y regiones constantes humanas.

Convenientemente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende:

- 5 un dominio variable de la cadena pesada que incluye las secuencias de aminoácidos de las tres CDRs en SEQ ID NO:7, y
un dominio variable de la cadena ligera que incluye las secuencias de aminoácidos de las tres CDRs en SEQ ID NO: 8, en donde el anticuerpo se une a properdina humana.

- 10 Ventajosamente, dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo exhibe al menos una de las propiedades funcionales: el anticuerpo inhibe la unión de properdina a C3b, el anticuerpo reduce la formación de C3bB, el anticuerpo reduce la formación de convertasa C3, el anticuerpo reduce la producción de C3a y C5a, el anticuerpo reduce la formación del complejo C5b-9, el anticuerpo reduce la activación de neutrófilos, el anticuerpo reduce la activación de monocitos, el anticuerpo reduce la activación de plaquetas o el anticuerpo reduce la formación de conjugados de leucocitos-plaquetas.

- 15 Preferiblemente, dicho anticuerpo o parte de unión de antígeno del mismo se une a oligómeros de properdina y fomenta la disociación de los oligómeros de properdina a monómeros de properdina.

- 20 Convenientemente, regiones variables de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente, y en donde las regiones variables de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente.

La presente invención comprende, además, un anticuerpo monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a SEQ ID NO: 2 y bloquea la activación de la vía alternativa sin afectar a la activación de la vía clásica en un mamífero, para uso como un medicamento.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Fig. 1 ilustra las tres vías de complemento del complemento.

La Fig. 2 ilustra un esquema de activación de AP.

La Fig. 3 ilustra un esquema de unión de anticuerpo anti-properdina, de acuerdo con un aspecto de la invención a oligómeros de properdina.

- 30 La Fig. 4 ilustra un esquema de la disociación de oligómeros de properdina por anticuerpos anti-properdina de acuerdo con un aspecto de la invención.

La Fig. 5 muestra la inhibición de la formación de C5b-9 por el CRSPRWLSWS (75-84) (SEQ ID NO: 4). La línea marcada con círculos en negro representa la inhibición peptídica de la formación de C5b-9. El eje X representa la concentración del péptido en la concentración $\mu\text{g/ml}$.

- 35 La Fig. 6 muestra la inhibición de la unión de properdina a C3b por CRSPRWLSWS (75-84) (SEQ ID NO: 4), pero no por el péptido QRRCTGLPPC (245-254) (SEQ ID NO: 6) de la región de TSR. Por las publicaciones anteriores se demostró que este péptido TSR 3 era inhibidor.

- 40 La Fig. 7 muestra la inhibición de la formación de C5b-9 por el péptido RYRRCVWNG (99-108) (SEQ ID NO: 5) del dominio TSR-1 de properdina. La línea marcada con círculos en negro representa la inhibición peptídica de la formación de C5b-9. El eje X representa el péptido (región 99-108) (SEQ ID NO: 5) concentración en $\mu\text{g/ml}$.

- 45 La Fig. 8 muestra la inhibición de la unión de properdina a C3b por RYRRCVWNG (99-108) (SEQ ID NO: 5), pero no por el péptido QRRCTGLPPC (245-254) (SEQ ID NO: 6) de la región de TSR. Por las publicaciones anteriores se demostró que este péptido TSR 3 era inhibidor. La línea marcada con círculos en negro representa el RYRRCVWNG (SEQ ID NO: 5) y los círculos en blanco muestran el QRRCTGLPPC (SEQ ID NO: 6). El eje Y representa la reactividad del péptido con C3b expresada como densidad óptica (OD) a 450 nm y el eje X representa la concentración del péptido.

- 5 La Fig. 9 muestra la inhibición de la hemólisis, dependiente de la vía alternativa, de eritrocitos de conejo por el péptido grande (71-110) que cubre ambas secuencias CRSPRWLSWS (SEQ ID NO: 4) y RYRRCVGVWNG (SEQ ID NO: 5). El ensayo de hemólisis es un ensayo celular para medir la formación de C5b-9. La línea marcada con círculos en negro representa la inhibición de la hemólisis con una inhibición mayor que 70% que se produce en una concentración de 100 μ M.
- La Fig. 10 muestra la unión de péptido (71-110) (SEQ ID NO: 2) a C3b unida a sustrato con el péptido TSR1 (69-110) (SEQ ID NO: 2), segmentos TSR5 y TSR6 de properdina. El eje Y representa la inhibición de la unión.
- 10 La Fig. 11 muestra la unión de saturación MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a TSR-1 (71-110) (SEQ ID NO: 2). La línea marcada con círculos en negro representa la unión del anticuerpo monoclonal MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ al fragmento de TSR-1 unido al sustrato. El eje X representa la concentración del anticuerpo monoclonal y el eje Y representa la cantidad de anticuerpo monoclonal unido al fragmento de TSR-1 unido al sustrato (71-110).
- La Fig. 12 muestra la unión de saturación de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a properdina. La unión del anticuerpo monoclonal está representada por los círculos en negro. El eje X representa sólo la concentración del anticuerpo monoclonal MoAb⁷¹⁻¹¹⁰.
- 15 La Fig. 13 muestra que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la activación dependiente de la vía clásica por parte de células de oveja sensibilizadas en anticuerpos en suero humano normal. Células de oveja sensibilizadas en anticuerpos activan la vía clásica en tampón que contiene Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. Seis concentraciones diferentes fueron evaluadas en el ensayo de hemólisis. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la vía clásica del complemento en suero humano normal. Concentraciones tan altas como 13,33 nM fueron testadas en suero al 1% que no causó la inhibición de la lisis mediada por CP.
- 20 La Fig. 14 muestra la inhibición de la hemólisis dependiente de la vía alternativa de eritrocitos de conejo por MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en suero humano normal. Se testaron nueve concentraciones del anticuerpo monoclonal tal como se muestra. Nada de plasma y plasma sin tratar sirvieron como controles. Eritrocitos de conejo activan la vía alternativa en tampón que contiene Mg/EGTA. El anticuerpo monoclonal inhibe la lisis de eritrocitos con una IC₅₀ de 10 nM.
- 25 La Fig. 15 muestra los trazados de los datos representados en la Fig. 14. Estos datos muestran el análisis de la curva de dosis de mediciones cinéticas realizadas en la hemólisis de rRBC dependiente de AP.
- La Fig. 16 muestra que la relación anticuerpo monoclonal a properdina en el plasma es de 1:1. Concentraciones equivalentes molares fueron capaces de inhibir la función de properdina en un 100%. Properdina en suero se basó en el valor de la bibliografía de properdina 200 nM en sangre entera. En el plasma, la concentración será de 400 nM a causa de una media de hematocrito cercana al 50%. Suero humano normal se diluyó a 50%, 25%, 20% y 15%. A cada una de las concentraciones se generaron curvas de dosis. Se calcularon los valores de IC₅₀ como un % de suero. Se calcularon los valores de nM de anticuerpo que dan un 50% de inhibición. Y representado frente a la concentración de properdina. Se obtuvieron los mismos resultados para los tres donantes. Los datos se promediaron y se calcularon los errores típicos.
- 30 La Fig. 17 muestra que la unión del factor B a C3b unida a properdina es de alta afinidad en comparación con su unión a C3b. La diferencia en la afinidad es casi de 20-30 veces.
- 35 La Fig. 18 muestra que properdina endógena no se une al fragmento C3dg. Properdina se une a C3b con alta afinidad en comparación con su unión a iC3b, y C3c.
- La Fig. 19 muestra que el Factor B no se une a iC3b, C3c y C3dg.
- 40 La Fig. 20 ilustra la inhibición de la unión de properdina a C3b por MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. La línea marcada con círculos en negro representa la curva de inhibición de properdina a la unión de C3b. La curva de inhibición se traza en base a la unión/inhibición de properdina a C3b. El eje X representa la concentración del anticuerpo monoclonal MoAb⁷¹⁻¹¹⁰.
- 45 La Fig. 21 ilustra la inhibición de la unión de properdina al complejo C3b + B por parte de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. La línea marcada con círculos en negro representa la curva de inhibición de properdina a la unión de C3b + B. La curva de inhibición se traza en base a la unión/inhibición de la properdina a C3b. El eje X representa la concentración del anticuerpo monoclonal MoAb⁷¹⁻¹¹⁰.
- La Fig. 22 ilustra la inhibición de la unión del factor B a C3b mediante disolución de C3b. Estos datos sugieren una unión preferencial de factor B C3b unida a sustrato.
- La Fig. 23 ilustra la inhibición de convertasa C3 dependiente de AP en suero humano normal activado por placas revestidas de LPS. El MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C3b como se indica por la falta de deposición de C3b.

Fig. 24 inhibición de convertasa C3 dependiente de AP en suero humano normal activado por las placas revestidas de LPS. El MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la deposición de properdina.

La Fig. 25 ilustra la inhibición de la convertasa C3 dependiente de AP en suero humano normal activado por las placas revestidas con LPS. El MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de Bb como se indica por la falta de deposición de Bb.

5 La Fig. 26 ilustra la inhibición de la formación de C5b-9 por parte de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. La línea marcada con círculo en negro representa la inhibición de la deposición de C5b-9 sobre la superficie revestida con LPS. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación mediada por LPS de la deposición de C5b-9. El eje X se refiere a la concentración del MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ que provoca la inhibición de la formación de C5b-9.

10 La Fig. 27 ilustra que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C3a durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. Según se describe en el Ejemplo 13, se evaluó el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a diversas dosis para la inhibición de la formación de C3a en un modelo de bucle de tubo de baipás cardiopulmonar. La Fig. 27 demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la formación de C3a con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

15 La Fig. 28 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la Formación de C5a durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera Humana. Plasma procedente del método de bucle de tubo también se evaluó para la formación de C5a como se describe en el Ejemplo 13. La Fig. 28 demuestra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C5a de forma dependiente de la dosis con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

20 La Fig. 29 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C5b-9 durante la circulación extracorpórea de sangre entera según se evidencia por el Ensayo de Hemólisis. C5b-9 es el componente terminal de la cascada del complemento y es conocido como el complejo de ataque a la membrana. De acuerdo con la Fig. 29, el tratamiento de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C5b-9 de forma dependiente de la dosis con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

25 La Fig. 30 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de neutrófilos durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. Partes alícuotas de sangre del método de bucle de tubo se evaluaron mediante citometría de flujo y los marcadores de activación celular apropiados. Los neutrófilos fueron evaluados utilizando anticuerpos CD15-FITC y CD11b-PE. Se evaluaron los efectos de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ sobre la activación celular. Esta figura demuestra la inhibición dependiente de la dosis de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ sobre la medida de activación de neutrófilos a través de la expresión de CD11b. De acuerdo con la figura, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ demuestra la inhibición completa a ~10 a 20 µg/ml. Estos resultados coinciden con los resultados que deberían ser el caso de C3a y C5a porque C3a y C5a son activaciones potentes de neutrófilos.

30 La Fig. 31 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de los monocitos durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. Utilizando los mismos principios que los neutrófilos, monocitos se tiñeron con CD14-FITC y CD11b-PE. La activación de monocitos se evaluó a través de la expresión de CD11b. El tratamiento de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ demuestra la inhibición dependiente de la dosis con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

35 La Fig. 32 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de plaquetas durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. Utilizando los mismos principios de las Figs. 27 y 28, las plaquetas se midieron utilizando anticuerpos de tinción contra plaquetas CD61-FITC y CD62P-PE. La activación plaquetaria fue evaluada por el nivel de expresión de CD62P. El tratamiento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ produjo resultados similares a los obtenidos para los neutrófilos y los monocitos. La figura demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la activación plaquetaria por parte del MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

40 La Fig. 33 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de agregados durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. Debido a la activación de plaquetas, las plaquetas se unen a otras plaquetas y leucocitos para formar agregados celulares. La presencia de agregados ha demostrado que conduce a una probabilidad incrementada de ataque al corazón. Durante la circulación extracorpórea, la inhibición de la formación de agregados se midió evaluando la presencia de plaquetas en las poblaciones de leucocitos como se describe en el Ejemplo 14.
45 El tratamiento con el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe completamente los agregados de forma dependiente de la dosis con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

50 La Fig. 34 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de TNF-alfa durante la circulación extracorpórea de sangre humana entera. La liberación de TNF-alfa se considera un marcador de la activación de los monocitos. Los monocitos son activados por las anafilotoxinas C3a y C5a. Para medir el efecto del MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la formación de TNF-alfa, se evaluaron muestras de plasma bucle de tubo en un ensayo ELISA sándwich. Tal como se muestra, el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibía de forma dependiente de la dosis la formación de TNF-alfa con una inhibición completa observada a ~10 µg/ml.

La Fig. 35 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ reduce los niveles de properdina libre en el plasma. Pocillos de ELISA se recubrieron con un anticuerpo policlonal a razón de 2 µg/50 µl por pocillo. Se añadió el suero que contenía diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal⁷¹⁻¹¹⁰ anti-properdina. La placa se incubó con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ biotinilado. Los resultados de muestran que el tratamiento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ redujo los niveles de properdina libre en el plasma.

5 La Fig. 36 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la liberación de elastasa de los neutrófilos en la circulación extracorpórea de sangre entera. Elastasa de los neutrófilos es un componente inflamatorio perjudicial que se libera durante la activación del complemento. Muestras de bucle de tubo tratadas con el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ se midieron usando un ensayo de elastasa en la casa. La figura demuestra que la inhibición del complemento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de neutrófilos y, por lo tanto, la elastasa de neutrófilos.

10 La Fig. 37 ilustra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la liberación de TNF-alfa en la circulación extracorpórea de sangre entera. TNF-alfa es la citoquina inflamatoria más potente liberada durante una respuesta inflamatoria. Está implicada en varias indicaciones de enfermedades y es principalmente la respuesta de exacerbar una respuesta inflamatoria. TNF-alfa es liberada cuando se activan los monocitos. Los autores de la invención evaluaron la generación de TNF-alfa durante la circulación extracorpórea y si MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ puede inhibir esa generación. La figura demuestra que la inhibición del complemento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de monocitos y, por lo tanto, de TNF-alfa.

La Fig. 38 ilustra una gráfica de la farmacodinámica del MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en conejos - evaluación de la actividad de AP en el suero.

La Fig. 39 ilustra una gráfica de la farmacodinámica de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en conejos - evaluación de properdina libre en la tasa sérica de la síntesis de properdina.

20 La Fig. 40 ilustra en una gráfica que la duración de la actividad del complemento es linealmente proporcional a la concentración de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰.

La Fig. 41 ilustra una gráfica de la tasa de la biosíntesis de properdina en conejos a los que se administró i.v. un bolo de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. El retorno de la actividad de AP con la síntesis de properdina se da a una dosis de 0,54 mg/kg.

25 La Fig. 42 ilustra una gráfica de la tasa de la biosíntesis de properdina en conejos a los que se administró i.v. un bolo de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. El retorno de la actividad de AP con la síntesis de properdina se da a una dosis de 1,41 mg/kg.

La Fig. 43 ilustra una gráfica de la desaparición de la cinética de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en suero de conejo como una función del tiempo.

La Fig. 44 ilustra un gráfico que muestra que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la formación dependiente de la vía clásica de C4d.

30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

El término "polipéptido" se utiliza en esta memoria como un término genérico para referirse a proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos y análogos son especies del género polipéptido.

35 La expresión "fragmento de polipéptido", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxilo-terminal, pero en donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce de forma natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de properdina de longitud completa. Los fragmentos típicamente son al menos de 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente de al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20 aminoácidos de longitud, habitualmente de al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente de al menos 70 aminoácidos de longitud.

"Anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o a un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por una unión específica. Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de una sola cadena. Un anticuerpo que no sea un anticuerpo 45 "biespecífico" o "bifuncional" se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un polipéptido a un participante en la unión específica cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad del polipéptido unido al participante de unión específica en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% u 80%, y más habitualmente en más de aproximadamente el 85% (según se mide en un ensayo de unión competitiva in vitro).

El término "monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se une a una secuencia de aminoácidos y tiene un solo epítipo específico en su antígeno diana. Por ejemplo, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ es un anticuerpo monoclonal que es específico sólo para la secuencia de aminoácidos 71-110 de properdina. Debido a que el anticuerpo es monoclonal, reconocería un dominio/motivo que contiene la secuencia contenida en los péptidos 71-110 (SEQ ID NO: 2).

- 5 El término "policlonal" se refiere a un anticuerpo que reconoce múltiples sitios epítipo en un solo antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo policlonal contra properdina indica que el anticuerpo se unirá a varios sitios de la proteína properdina.

10 El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina. Determinantes epítipos consisten habitualmente en agrupaciones en superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

15 Los términos "oligómero" y "polímero" se utilizan de manera indistinta. Los términos "oligómero" y "polímero" se refieren a la asociación de más de un monómero de una proteína, péptido o fragmentos de péptidos específicos. Los términos "oligómero" y "polímero" en esta invención se refieren específicamente a la capacidad de los monómeros de proteína properdina a formar complejos de proteínas con ella o con otras proteínas.

El término "agente" se utiliza en esta memoria para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

Los términos y expresiones "paciente", "huésped mamífero" y similares se utilizan indistintamente en esta memoria, y se refieren a mamíferos, incluidos los sujetos humanos y veterinarios.

- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se utiliza en esta memoria, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o en riesgo de adquirir la enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

30 La expresión "una enfermedad o trastorno asociado con la vía alternativa del complemento", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una enfermedad o trastorno causado, directa o indirectamente, por la activación de la vía alternativa del complemento, una enfermedad o trastorno que está mediado, directa o indirectamente, por uno o más componentes de la vía alternativa del complemento, o un producto generado por la vía alternativa del complemento. La expresión también se refiere a una enfermedad o trastorno que se ve agravado por uno o más componentes de la vía alternativa del complemento, o un producto generado por la vía alternativa del complemento.

35 El término "inactivado" se refiere a la técnica en la que un gen o genes específicos se separan de un animal diana. Esta técnica se aplica habitualmente a los roedores en los que el gen de interés se separa a través de recombinación homóloga de un vector vacío con el cromosoma del animal nativo. La técnica funciona mediante el canje del cromosoma del animal que contiene el gen con el vector vacío que contiene un marcador o secuencias de ADN al azar. Este método resulta en un animal que es deficiente del gen de interés. La presente invención utilizaría esta técnica para generar anticuerpos contra un antígeno que se separa del genoma del animal para potenciar la generación de anticuerpos.

Se ha de entender que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que la misma puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en esta memoria es para describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

- 45 Cuando se proporcione un intervalo de valores, se entiende que queda abarcado dentro de la invención cada uno de los valores intermedios, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro establecido o valor intermedio en ese intervalo establecido. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y están quedan abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos.

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a properdina (es decir, el anticuerpo anti-properdina) y al uso de tales anticuerpos para inhibir la activación de la vía alternativa del complemento. Los anticuerpos anti-properdina de la presente invención se dirigen a o se unen específicamente a dominios en properdina que están implicados en el control de la función de properdina. Los anticuerpos anti-properdina o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden inhibir la activación de la vía alternativa del complemento sin inhibir o efectuar la activación del complemento clásica, así como inhibir la unión de properdina (oligómero/monómero) a C3b, inhibir la unión de properdina a factor B, inhibir la unión de properdina a complejo C3bB, inhibir la escisión del factor B mediante el factor D, reducir la semivida de la convertasa C3, prevenir la oligomerización de monómeros de properdina mediante el bloqueo del extremo N de properdina que se asocia con TSR6 para generar oligómeros, reducir la formación del complejo de ataque a la membrana C5b-9, reducir la formación de anafilotoxinas, p. ej., C3a y/o C5a, reducir la formación de C3b, reducir la activación de los neutrófilos, monocitos y plaquetas, y/o reducir la formación de agregados de leucocitos.

Estudios han demostrado que la afinidad de properdina a C3b se ve potenciada por el factor B (DiScipio, RG, *The binding of human complement proteins C5, factor B, beta 1H and properdin to complement fragment C3b on zymosan*. Biochem J, 1981. 199 (3): págs. 485-96). Por lo tanto, el factor B y P están en estrecha proximidad en el complejo trimolecular. La asociación de factor B con C3b potencia adicionalmente la afinidad de unión de P a C3bB. El complejo PC3bB está orientado para el ataque por factor D sobre el factor B para generar fragmentos Ba y Bb. Ba y Bb libres no se unen a C3b y, por lo tanto, no afectaría a la unión de properdina a C3b. La unión de properdina a factor D facilita la escisión del factor B por parte del factor D. Como resultado, Ba se libera y Bb permanece unida a C3b. El complejo activo PC3bBb, una serina proteasa, escinde C3 para generar moléculas de C3b adicionales. Se ha demostrado que la properdina estabiliza el complejo de convertasa PC3bBb y la semivida se incrementa al menos 10 veces (Fearon, D.T. y K.F. Austen, *Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase*. J Exp Med, 1975. 142 (4): págs. 856-63.).

Se conocen las secuencias de aminoácidos de properdina de mamíferos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de properdina humana se describe en la base de datos GenBank bajo el N° de Acceso AAA36489 como SEQ ID NO: 1. Properdina humana (SEQ ID NO: 1) es una proteína de 469 aminoácidos que incluye un péptido señal (aminoácidos 1-28), y seis repeticiones de trombospondina tipo 1 (TSR) no idénticas de aproximadamente 60 aminoácidos cada una, como sigue: aminoácidos 80-134 (TSR1), aminoácidos 139-191 (TSR2), aminoácidos 196-255 (TSR3), aminoácidos 260-313 (TSR4), aminoácidos 318-377 (TSR5) y aminoácidos 382-462 (TSR6). Reid et al han demostrado que las seis TSRs de properdina tienen diferente función, estando TSR 5 implicada en la función de properdina (Higgins, J.M., et al., *Characterization of mutant forms of recombinant human properdin lacking single thrombospondin type I repeats. Identification of modules important for function*. J Immunol, 1995. 155 (12): págs. 5777-85). Estos estudios utilizaron anticuerpo monoclonal de TSR5 policlonal para inhibir la hemólisis dependiente de la vía alternativa de eritrocitos de conejo. Estudios adicionales de los mismos autores demostraron que las deleciones de TSRs 3, 4 y 6 no afectaron a la función de properdina. Ambos estudios muy intensos sugirieron que TSR5 es la responsable de la unión a C3b de properdina.

De forma inesperada, se encontró que la región N-terminal de properdina, incluyendo la primera mitad de la TSR1, es importante para las funciones de properdina y que los anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a un epítipo de la región N-terminal (p. ej., SEQ ID NO: 2, es decir, la región de aminoácidos 71-110 de SEQ ID NO: 1), puede inhibir la función de properdina.

Una realización de la presente invención se refiere, por lo tanto, a anticuerpos anti-properdina que pueden unirse al segmento N-terminal que abarca la TSR1 de properdina. Anticuerpos monoclonales anti-properdina de acuerdo con la invención, debido a su gran peso molecular, pueden tener potencialmente algunos efectos de apantallamiento sobre TSR6 en una properdina dímera, trímera y tetrámera y, como resultado, se suprime la función de TSR6. Monómeros de properdina se asocian de una forma de cabeza a cola con el dominio (N terminal + TSR1) que se asocia con TSR6 de un segundo monómero de properdina. Como resultado, se ensamblan properdina dimérica, trimérica y tetramérica. La implicación de TSR6 se demostró en un estudio en el que TSR6 se eliminó en un mutante de properdina. Una preparación de este tipo de properdina no produjo dímeros, trímeros y tetrámeros de properdina.

Anticuerpos anti-properdina se pueden seleccionar en base a su capacidad para inhibir la hemólisis dependiente de AP de rRBC (eritrocitos de conejo) y luego se pueden rastrear en base a su capacidad para unirse a secuencias de proteínas seleccionadas presentes en la región N-terminal de properdina. Estos anticuerpos pueden unirse a properdina en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:1. Properdina existe en la sangre como un dímero, trímero, tetrámero en una relación de 1:2:1. Por lo tanto, dímeros de properdina unirán dos anticuerpos anti-properdina, trímeros de properdina unirán tres anticuerpos anti-properdina y tetrámeros de properdina unirán cuatro anticuerpos anti-properdina (Fig. 3).

Sólo formas oligoméricas de properdina se consideran activas. Properdina oligomérica une C3b e inicia la activación de AP. La Fig. 4 ilustra que tras la unión al extremo de un monómero de properdina de un oligómero de properdina, los anticuerpos anti-properdina de la presente invención provocarán la disociación de los oligómeros de properdina

en monómeros inactivos de properdina. Monómeros inactivos de properdina con anti-properdina unida son incapaces de polimerización para formar oligómeros de properdina activados y son incapaces de unirse en forma de monómero a C3b o complejo de C3bB. En otras palabras, la disociación de oligómeros de properdina en monómeros de properdina se inactivarán la properdina activada. Una inactivación de este tipo de oligómeros de properdina mediante anticuerpos anti-properdina de la presente invención evitará la unión de properdina oligomérica a C3b e inhibirá la activación de la vía alternativa en la sangre. La inhibición de la activación de complemento por la vía alternativa hará que los niveles reducidos de C3a, C5a y C5b-9 e inhibirá la activación de monocitos, inhibirá la formación de monocitos-plaquetas e inhibirá agregados de neutrófilos-plaquetas.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo anti-properdina se une específicamente a un epítipo del extremo N-terminal de properdina y, por lo tanto, bloquea la unión de TSR6 al extremo N-terminal de properdina (p. ej., la región N-terminal y la región de TSR1 (SEQ ID NO: 3) de properdina (SEQ ID NO: 1)). Por ejemplo, el anticuerpo anti-properdina puede unirse específicamente a un epítipo que comprende al menos una región parte de al menos una de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5. Por lo tanto, el anticuerpo puede prevenir la oligomerización de monómeros de properdina. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-properdina se une no específicamente a otras TSRs del polipéptido properdina, p. ej., en los casos en los que un epítipo es compartido entre dos o más TSRs, y en los casos en los que los epítopos compartidos pueden, pero no necesitan ser idénticos en la secuencia de aminoácidos.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-properdina inhibe la unión de properdina a C3b. En estas realizaciones, el anticuerpo anti-properdina afecta a la unión en una relación molar de anticuerpo a properdina de aproximadamente 0,5:1, una relación molar de anticuerpo a properdina de aproximadamente 1:1, una relación de anticuerpo a properdina de aproximadamente 1,5:1 y un máximo de aproximadamente 10:1 de anticuerpo a properdina. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-properdina afecta a la unión en una relación de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 1,5:1. Se ha estimado que la concentración de properdina en suero es de 20 µg/ml (Chapitis, J. e I.H. Lepow, *Multiple sedimenting species of properdin in human serum and interaction of purified properdin with the third component of complement*. J Exp Med, 1976. 143 (2): págs. 241-57). Niveles calculados en sangre entera estarían en el intervalo de 10 µg/ml considerando un 50% de hematocrito. En base a estos supuestos, la concentración en sangre de properdina es 200 nM. Sorprendentemente, el anticuerpo de la presente invención neutraliza properdina 200 nM con anticuerpo monoclonal 200 nM. Tres donantes demostraron resultados consistentes.

El anticuerpo anti-properdina de la presente invención también pueden inhibir el nivel de properdina funcional en un huésped mamífero. Properdina funcional significa moléculas de properdina capaces de activar la vía alternativa. La properdina es importante para la activación de la vía alternativa y el nivel de properdina en sangre afecta a la cantidad de la vía alternativa del complemento en sangre. El anticuerpo de la presente invención reduce el nivel de properdina funcional requerido para la función de AP. La cantidad de properdina funcional se cuantifica utilizando un ELISA sándwich en el que la properdina está emparejada entre los anticuerpos monoclonal y policlonal. Sorprendentemente, el anticuerpo NTSR reduce el nivel de properdina funcional en la sangre humana.

El anticuerpo anti-properdina puede reducir aún más los niveles de uno o más componentes de la vía alternativa del complemento y / o uno o más factores producidos por la acción de uno o más componentes de la vía alternativa del complemento. Ejemplos ilustrativos no limitativos de componentes y factores que se reduce incluyen MAC (C5b-9), C3c, y anafilotoxinas tales como C3a y C5a, y similares. El anticuerpo anti-properdina reduce los niveles de uno o más componentes de la vía alternativa del complemento y/o uno o más factores producidos por la acción de uno o más componentes de la vía alternativa del complemento en al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30% , al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o más, en comparación con el nivel del componente o factor en la ausencia del anticuerpo objeto.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo anti-properdina puede unirse a properdina con alta afinidad, inhibir la oligomerización de properdina, inhibir la escisión mediada por el factor D de factor B en un complejo C3bB, no inhibir la vía clásica del complemento, prevenir la activación de la vía alternativa del complemento, inhibir la formación de C3a, C5a y C5b-9, Inhibir la activación de neutrófilos, monocitos y plaquetas. Inhibir la formación de conjugados de plaquetas y leucocitos.

Un ejemplo de un anticuerpo anti-properdina de acuerdo con la presente invención que se une específicamente a SEQ ID NO: 2 fue aislado y caracterizado estructuralmente como se describe en los Ejemplos. Los Ejemplos de la presente solicitud describen un anticuerpo anti-properdina identificado como MoAbB⁷¹⁻¹¹⁰ que es producido por la línea celular de hibridoma depositada con el Número de Acceso ATCC PTA-9019. Se encontró que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la activación de la vía alternativa del complemento. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la escisión mediante el factor D del complejo C3bB. C3b producido por la escisión de C3 se une al factor B para producir el complejo C3bB. La unión de properdina al complejo C3bB fomenta la escisión inducida por el factor D del factor B. La evidencia proviene de

estudios que utilizan suero agotado en properdina, que no tiene actividad del complemento, sugiriendo que el complejo C3bB no se puede formar y ni escindir con el factor D en ausencia de properdina. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ evita la escisión por el factor D del complejo PC3bB. Tal como se muestra en la Fig. 11, el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ evita la hemólisis de rRBC (eritrocitos de conejo) en tampón AP.

5 Adicionalmente, mientras que la properdina es una parte del bucle de amplificación, y en teoría debería tener efecto sobre la activación de la vía clásica, sorprendentemente MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no tiene efecto alguno sobre la activación de la vía clásica. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ es un anticuerpo específico de la vía alternativa y se une a una región en properdina que sólo está implicada en la activación de AP. El uso de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ mantendrá la vía clásica (CP) intacta para la defensa del huésped, un beneficio significativo frente al anticuerpo anti-properdina descubierto por Gupta-Bansal (Mol Immunol, 2000. 37(5): págs.191-201) y descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.338.034. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de inhibir la activación alternativa del complemento sin inhibir la activación de la vía clásica in vitro e in vivo en un sujeto humano o animal.

15 En otra realización, se determinaron las regiones codificadoras variables de la cadena pesada y las regiones codificadoras variables de la cadena ligera de Moab⁷¹⁻¹¹⁰. La secuencia de aminoácidos de V_H de Moab⁷¹⁻¹¹⁰ se muestra en SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos de V_L de Moab⁷¹⁻¹¹⁰ se muestra en SEQ ID NO: 8. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; en donde el anticuerpo se une específicamente a la properdina humana.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a anticuerpos que componen las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera de Moab⁷¹⁻¹¹⁰, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR 1, 2 y 3 de V_H se muestran en SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR 1, 2 y 3 de V_L se muestran en SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 9, 10, y 11, respectivamente; (b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, respectivamente; en donde el anticuerpo se une específicamente a properdina humana.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos que se unen al mismo epítipo en la properdina humana que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ (que tiene secuencias V_H y V_L tal como se muestra en SEQ ID NOs: 7 y 8). Tales anticuerpos pueden ser identificados en base a su capacidad de competir de forma cruzada con el Moab⁷¹⁻¹¹⁰ en ensayos de unión a properdina estándares. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a properdina humana demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en cuanto a la unión a properdina humana y, por lo tanto, se une al mismo epítipo en la properdina humana que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. En un aspecto de la invención, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en la properdina humana que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ es un anticuerpo monoclonal humano. Anticuerpos monoclonales humanos de este tipo pueden prepararse y aislarse según se describe en los Ejemplos.

40 Todavía en otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en esta memoria, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de la invención anti-properdina. Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (b) la cadena ligera de la región variable comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y (c) el anticuerpo se une específicamente a properdina humana.

45 En diversos aspectos, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En otros aspectos, las secuencias de aminoácidos de V_H y/o V_L pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones V_H y V_L que tienen una alta (es decir, 80% o más) homología con las regiones V_H y V_L de las secuencias expuestas anteriormente, se puede obtener por mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NO: 7 u 8, seguido de someter a ensayo el anticuerpo alterado codificado para la función retenida (es decir, las funciones recogidas en (c) y (d) anterior) utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

55 Tal como se utiliza en esta memoria, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n°

de posiciones idénticas/nº total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático, según se describe en los ejemplos no limitantes de más adelante.

5 En determinados aspectos, un anticuerpo de la invención puede incluir una región de cadena pesada variable que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos especificadas, basadas en los anticuerpos preferidos descritos en esta memoria (p. ej., MoAb⁷¹⁻¹¹⁰), o modificaciones conservadoras de la misma, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales
10 deseadas de los anticuerpos anti-CD64 de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: (a) la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, o modificaciones conservativas de la misma;
15 (b) la secuencia de CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o modificaciones conservativas de la misma; y (c) el anticuerpo se une específicamente a properdina humana.

En un ejemplo más específico, la secuencia de CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia de CDR2
20 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o modificaciones conservativas de la misma. En un ejemplo todavía más específico, la secuencia de CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, o modificaciones conservativas de la misma; y la secuencia de CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o modificaciones conservativas de la misma.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "modificaciones de la secuencia conservativas" pretende referirse a modificaciones de los aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden ser introducidas en un anticuerpo de la invención por técnicas estándares conocidas en la técnica tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis
30 mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden ser reemplazados por otros
35 residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado pueden ser testados en cuanto a la función de retenida (es decir, las funciones establecidas en (c) a (j) arriba) utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

Un anticuerpo de la invención se puede preparar, además, utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en esta memoria como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede
45 diseñarse por ingeniería genética mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de residuos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones
50 determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre los anticuerpos individuales que secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos que se producen de forma natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico que se produce de forma natural injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes. Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NOs: 9, 10, y 11, respectivamente, y una región
55

variable de cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12, 13, y 14, respectivamente. Por lo tanto, dichos anticuerpos que contienen las secuencias CDR V_H y V_L de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ todavía pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

5 Otro tipo de modificación de la región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones V_H y V_K de CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (p. ej., afinidad) del anticuerpo de interés. Se puede realizar una mutagénesis dirigida al sitio o una mutagénesis mediada por PCR para introducir la o las mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar mediante ensayos in vitro o in vivo según se describe en esta memoria y se proporciona en los Ejemplos. Se introducen modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente). Las mutaciones pueden ser
10 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Además de ello, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-properdina aislados, o partes de unión a antígeno de los mismos, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:
15 (a) regiones V_H de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 9, 10, y 11, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NOs: 9, 10 y 11; (b) regiones V_K de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 12, 13 y 14.

20 **Anticuerpos Humanos**

Una importante aplicación práctica de una estrategia de este tipo es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de loci de la inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que los genes IgG endógenos han sido inactivados ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia podría
25 proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (MoAbs) - un hito importante hacia el cumplimiento de la promesa de la terapia con anticuerpos en las enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos totalmente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a MoAbs de ratón o derivatizados de ratón y aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el
30 tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpos.

Un enfoque hacia este objetivo es diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de IgG humana en previsión de que dichos ratones producirían un gran repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Grandes fragmentos de IgG humana preservaría
35 la gran diversidad genética variable, así como la adecuada regulación de la producción y expresión de anticuerpos. Mediante la explotación de la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cepas de ratón debe producir anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridoma, se podrían producir y seleccionar fácilmente MoAbs humanos
40 específicos para antígenos con la especificidad deseada.

Respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA): Mientras que los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera que se observarán determinadas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), particularmente en utilidades crónicas o multi- dosis del anticuerpo. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos totalmente humanos contra properdina con el fin de viciar
45 preocupaciones y/o efectos de la respuesta HAMA o HACA.

Tecnologías de Humanización y Visualización

Tal como se discutió anteriormente en relación con la generación de anticuerpos humanos, existen ventajas en la producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida. Hasta cierto punto, esto se puede lograr en relación con técnicas de humanización y de visualización utilizando los bancos apropiados. Se apreciará que los anticuerpos
50 murinos o anticuerpos de otras especies pueden humanizarse o primatizarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica.

Fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab pueden prepararse por escisión de la proteína intacta, p. ej., mediante escisión por proteasa o química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio de CH1

y la región de bisagra de la cadena H, seguido por un codón de parada de la traducción para producir la molécula truncada.

- Además, anticuerpos o anticuerpos humanos de otras especies pueden ser generados a través de las tecnologías de tipo de visualización, incluyendo, sin limitación, la visualización de fagos, la visualización retroviral, la visualización ribosomal, y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, y las moléculas resultantes puede ser sometidas a maduración adicional, tal como maduración de la afinidad, ya que tales técnicas son bien conocidas en la técnica.

Criterios Adicionales para Productos Terapéuticos de Anticuerpos

- Tal como se discute en esta memoria, la función de un anticuerpo anti-properdina objeto parece importante para al menos una parte de su modo de funcionamiento. Por función, los autores de la invención se refieren, a modo de ejemplo, a la actividad del anticuerpo anti-properdina en la inhibición de la vía alternativa del complemento, por ejemplo, un anticuerpo anti-properdina objeto exhibe una o más de las siguientes propiedades: (1) inhibe la unión de properdina oligomérica a C3b (o C3bB); (2) reduce la formación de C3bBb, (3) inhibe la oligomerización de monómeros de properdina; (4) fomenta la disociación de properdina oligomérica en monómeros, (5) reduce la formación de properdina libre, (6) reduce la formación de C3b, (7) reduce la formación de C3a, C5a y MAC, (8) reduce la expresión de monocitos CD11b, (9) reduce la expresión de neutrófilos CD11b, (10) reduce la expresión de CD62 P plaquetaria, (11) reduce la formación de conjugado de leucocitos-plaquetas y (12) reduce el factor de necrosis tumoral alfa (TNF).

Diseño y Generación de Otros Productos Terapéuticos

- Se pueden facilitar otras modalidades terapéuticas más allá de los restos de anticuerpos. Estas modalidades incluyen, sin limitación, productos terapéuticos de anticuerpos avanzados tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, y productos terapéuticos radiomarcados, la generación de productos terapéuticos peptídicos, terapias genéticas, particularmente intracuerpos, productos terapéuticos antisentido y moléculas pequeñas. En relación con la generación de productos terapéuticos de anticuerpos avanzados, en donde la fijación del complemento es un atributo deseable, puede ser posible eludir la dependencia del complemento para la muerte celular utilizando productos biespecíficos, inmunotoxinas o radiomarcadores, por ejemplo.

- Se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos uno con una especificidad para properdina y otro para una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para properdina y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad para properdina y para la otra molécula. Anticuerpos biespecíficos de este tipo pueden generarse utilizando técnicas que son bien conocidas, por ejemplo, en relación con (i) y (ii) (Fanger, M.W., R.F. Graziano y P.M. Guyre, *Production and use of anti-FcR bispecific antibodies*. Immunomethods, 1994. 4(1): págs. 72-81) y en relación con (iii) (Traunecker, A., A. Lanzavecchia y K. Karjalainen, *Janusin: new design for bispecific reagents*. Int J Cancer Suppl, 1992. 7: págs. 51-2). En cada uno de los casos, la segunda especificidad se puede hacer a los receptores de activación de la cadena pesada, incluyendo, sin limitación, CD16 o CD64 (Deo, Y.M., et al., *Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies*. Immunol Today, 1997. 18(3): págs 127-35) o CD89 (Valerius, T., et al., *FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy*. Blood, 1997. 90(11): págs. 4485-92). Sería probable que anticuerpos biespecíficos preparados de acuerdo con lo anterior mataran células que expresan properdina y particularmente aquellas células en las que son eficaces los anticuerpos anti-properdina de la invención.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de la información estructural relacionada con properdina y anticuerpos de la misma tales como los anticuerpos de la invención (como se discute más adelante en relación con moléculas pequeñas) o el rastreo de bancos de péptidos, se pueden generar péptidos terapéuticos que se dirigen contra properdina.

- Asumiendo que la molécula de properdina (o una forma tal como una variante de corte y empalme o forma alternativa) es funcionalmente activa en un proceso de enfermedad, también será posible diseñar genes y productos terapéuticos antisentido para los mismos a través de técnicas convencionales. Tales modalidades se pueden utilizar para modular la función de properdina.

Usos Terapéuticos

- El anticuerpo anti-properdina o fragmentos del mismo se pueden utilizar en métodos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mediadas, directa o indirectamente, por un componente de la vía alternativa del complemento, y/o por un factor generado después de la activación de la vía alternativa del complemento. El anticuerpo anti-properdina

evita los problemas asociados con anticuerpos de roedores, es decir, reacciones adversas en seres humanos tales como reacciones de hipersensibilidad, incluyendo urticaria, disnea, hipotensión, anafilaxia y similares.

En un aspecto de la invención, los anticuerpos pueden utilizarse para inhibir la activación del complemento por la vía alternativa in vivo en sujetos, incluyendo seres humanos, que padecen una lesión patológica aguda o crónica tal como, pero no limitado a aterosclerosis, isquemia-reperfusion después de un infarto de miocardio agudo, nefritis púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis por complejos inmunes, artritis reumatoide, arteritis, aneurisma, accidente cerebrovascular, cardiopatía, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, insuficiencia orgánica múltiple, choque hipovolémico e isquemia intestinal, rechazo de trasplantes, cirugía cardíaca, PTCA, aborto espontáneo, lesión neuronal, lesión de la médula espinal, miastenia grave, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión, lesión pulmonar aguda, enfermedad de Goodpasture, infarto de miocardio, inflamación de baipás post-cardiopulmonar, baipás cardiopulmonar, choque séptico, rechazo de trasplantes, xenotrasplante, lesiones por quemaduras, lupus eritematoso sistémico, nefritis membranosa, enfermedad de Berger, psoriasis, penfigoide, dermatomiositis, síndrome anti-fosfolípido, enfermedad inflamatoria del intestino, hemodiálisis, leucoféresis, plasmaféresis, precipitación LDL de oxigenación de la membrana extracorpórea inducida por heparina, oxigenación por membrana extracorpórea y degeneración macular. La inhibición in vivo de la activación de la vía alternativa del complemento se lleva a cabo mediante la administración del anticuerpo al sujeto.

En un ejemplo, los anticuerpos anti-properdina se pueden utilizar en un proceso de circulación extracorpórea tal como los procesos de baipás cardiopulmonares (CPB) en un sujeto. En estos procesos, la sangre circulante se puede hacer pasar de un vaso sanguíneo del sujeto, a través de un conducto y de vuelta a un vaso sanguíneo del sujeto. El conducto puede tener una superficie luminal que comprende un material capaz de causar al menos uno de activación del complemento, activación de plaquetas, activación de leucocitos o adhesión de plaquetas-leucocitos en la sangre del sujeto. Un anticuerpo anti-properdina puede introducirse en el torrente sanguíneo del sujeto en una cantidad eficaz para reducir al menos uno de activación del complemento, activación de plaquetas, activación de leucocitos o adhesión de plaquetas-leucocitos resultante del paso de la sangre circulante a través del conducto. La sangre del sujeto se puede hacer pasar a través del conducto antes y/o después de la etapa de introducción del anticuerpo anti-properdina o fragmento de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo anti-properdina reduce la conversión dependiente de la vía alternativa del componente del complemento C3 en los componentes del complemento C3a y C3b, y/o la formación dependiente de la vía alternativa de C5b-C9, y/o la activación de leucocitos dependiente de la vía alternativa.

Administración y Formulaciones Terapéuticas

Se apreciará que las entidades terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con adecuados soportes, excipientes y otros agentes que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejorada transferencia, entrega, tolerancia, y similares. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (aniónicos o catiónicos) (tales como LIPFECTIN), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite-en-agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semi-sólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, si el ingrediente activo en la formulación no es inactivado por la formulación y la formulación es fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración.

Preparación de anticuerpos

Anticuerpos de acuerdo con la invención se preparan en ratón utilizando métodos estándares bien conocidos en la técnica. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se convertirá en una versión humanizada para uso terapéutico. El anticuerpo puede ser transformado por contrato o en casa en humanizado, completamente humano, quimérico, recombinante para uso terapéutico. Las líneas celulares de hibridoma aquí discutidas son generadas fácilmente por los expertos en la técnica, teniendo en cuenta la orientación proporcionada en esta memoria. Los anticuerpos producidos por las líneas celulares objeto no generan una respuesta adversa. La respuesta adversa se define como una respuesta no deseada.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero no limitadas a células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), y un cierto número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen niveles elevados de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión constitutiva a properdina.

Los resultados de la presente invención indican que los anticuerpos se pueden hacer más eficaces que los anticuerpos disponibles en la actualidad contra properdina y, por lo tanto, serán eficaces en el tratamiento de trastornos asociados con y/o mediados por la vía alternativa del complemento.

5 Anticuerpos de la presente invención también pueden generarse utilizando ratones inactivados con properdina, roedores para generar anticuerpos bloqueantes eficaces. Debido a que estos roedores no contienen el gen de properdina, los roedores verían la inyección de properdina como un antígeno inmunogénico en lugar de una proteína normal presente en el sistema. Debido a este reconocimiento de la properdina inyectada como un antígeno, el roedor generará anticuerpos contra él. El beneficio de utilizar un roedor inactivado permite una mayor probabilidad para la generación de un anticuerpo que es anti-rata, anti-ratón y anti-cualquier otra especie, dependiendo del roedor que se esté utilizando, es más fácil de generar el potencial para la generación de anticuerpos que son quiméricos o humano. Se han generado varios anticuerpos terapéuticos utilizando modelos XenoMouse para generar anticuerpos en ratones que son quiméricos o totalmente humanos (Davis, C.G., M.L. Gallo y J.R. Corvalan, *Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 1999. 18(4): págs. 421-5; Green, L.L., *Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies*. J Immunol Methods, 1999. 231(1-2): págs. 11-23; Wells, W.A., *Eek, a XenoMouse: Abgenix, Inc*. Chem Biol, 2000. 7(8): págs. R185-6). También es posible tener una doble inactivación para properdina e inmunoglobulina para generar el anticuerpo anti-properdina quimérico y totalmente humano.

20 Anticuerpos humanos contra una diversidad de antígenos también pueden producirse a partir de mamíferos transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana. Típicamente estos loci de inmunoglobulina pueden codificar anticuerpos de secuencia sustancialmente humana, preferiblemente 95% o más idénticos a secuencias humanas, más preferiblemente 98-99% o más idénticos, y lo más preferiblemente 100% idénticos. Los loci de inmunoglobulina pueden ser reordenados o no reordenados, y pueden comprender deleciones o inserciones respecto a los loci naturales de inmunoglobulina humana. Los loci pueden incluir elementos genéticos (p. ej., elementos no codificadores tales como potenciadores, promotores, secuencias de conmutación, o elementos codificadores tales como los segmentos de genes de la región constante mu) de otras especies, y de loci de no inmunoglobulina, que no contribuyen sustancialmente en la parte codificadora de anticuerpos del repertorio secundario (no IgM). Los loci de inmunoglobulina humana contenidos en estos mamíferos transgénicos incluyen preferiblemente secuencias no reordenados de loci de cadena pesada humanos naturales y de cadena ligera humanos. Habitualmente, el locus de inmunoglobulina endógena de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado (patente de EE.UU. Nº 5.589.369, Takeda, S. et al., 1993, *EMBO J.* 12:2329-2366; Jakobovits, A., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:2551-2555; Kitamura, D. y Rajewsky, K., 1992, *Nature* 356: 154-156; Gu, H. et al., 1991, *Cell* 65:47-54; Chen, J. et al., *EMBO J.* 12:821-830; Sun, W. et al., 1994, *J. Immunol* 152:695-704; Chen, J. et al., 1993, *Intl. Immunology* 5:647-656; Zou, X. et al., 1995, *Eur. J. Immunol* 25:2154-2162; Chen, J. et al., 1993 *Intl. Immunology* 5:647-656; Boudinot, P., et al, 1995, *Eur. J. Immunol.* 25:2499-2505; Chen, J. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:4528-4532; Roes, J. y Rajewsky, K., 1991, *Intl. Immunology* 3:1367-1371; Gu, H. et al., 1993, *Cell* 73:1155-1164; Taki, S. et al., 1993, *Science* 262: 1268-71; Kitamura, D. et al., 1991, *Nature* 350:423-6; Lutz, C. et al., 1998, *Nature* 393:797-801; Zou, Y. et al, 1994, *Current Biology* 4: 1099-1103; Chen, J. et al., 1993, *EMBO J.* 12:4635-4645; Serwe, M. y Sablitzky, F., 1993, *EMBO J.* 12:2321-2327; Sanchez, P. et al., 1994, *Intl. Immunology* 6:711-719; Zou, Y. et al., 1993, *EMBO J.* 12:811-820). La inactivación de genes de inmunoglobulina endógenos preferiblemente se puede lograr, p. ej., mediante recombinación homóloga dirigida. A los loci de inmunoglobulina humana exógenos se pueden asociar los cromosomas de ratón endógenos o pueden ser (p. ej., parte de, insertada dentro o unido a) un transcromosoma introducido. Los transcromosomas se introducen en una célula como un fragmento de cromosoma o cromosomas no endógenos que tienen un centrómero y dos telómeros. Estos transcromosomas comúnmente comprenden secuencias de telómeros y centrómeros y pueden comprender deleciones respecto al cromosoma intacto parental. Los transcromosomas también pueden comprender secuencias insertadas adicionales. Un solo transcromosoma que comprende dos o tres loci de inmunoglobulina diferentes proporciona un enlace genético de estos loci que aumenta la fracción de descendencia transgénica que son útiles para la fabricación de anticuerpos humanos. Formas preferidas de transcromosomas son las descritas en detalle en Tomizuka, K. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:722-727, Tomizuka, K. et al, 1997, *Nature Genetics* 16:133-143, y documentos WO 97/07671, WO 98/37757 y WO 00/10383, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines. Los transcromosomas también pueden incluir marcadores seleccionables integrados y otras secuencias que no se encuentran en el cromosoma intacto parental. En el caso de la recombinación entre un transcromosoma y un cromosoma endógeno de ratón, secuencias del transcromosoma se insertan o se añaden al cromosoma endógeno de ratón. Los transcromosomas pueden modificarse mediante deleción, traslocación, sustitución y similares, según se describe en los documentos WO 98/37757, EP 0972445 y WO 00/10383, que se incorporan en esta memoria como referencia para todos los fines. Por ejemplo, los transcromosomas pueden fragmentarse espontáneamente en el curso de la introducción en las células madre embrionarias de ratón (ES), fragmentarse mediante truncamiento dirigido por telómeros y/o translocarse mediante recombinación específica de sitio Cre/loxP o métodos similares. Tales eventos de recombinación o de translocación pueden ser fomentados insertando específicamente sitios de recombinación (p. ej., secuencias loxP y otras; véase, p. ej., Abuin, A. y Bradley, A., 1996, *Mol. Cell Biol.* 16: 1851-1856; Mitani, K. et al., 1995, *Somat. Cell. Mol. Genet.* 21:221-231; Li, Z. W. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:6.158-6162;

Smith, A J. et al., 1995, *Nat. Genet.* 9:376-385; Trinh, K R. y Morrison, S. L., 2000, *J. Immunol. Methods* 244:185-193; Sunaga, S. et al., 1997, *Mol. Reprod Dev.* 46: 109-113; Dymecki, S. M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:6191-6196; Zou, Y R. et al., 1994, *Curr. Biol.* 4: 1099-1103; Rudolph, U. et al., 1993, *Transgenic Res.* 2:345-355; Rickert, R. C. et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:1317-1318). En el caso de sitios loxP introducidos, la expresión de un transgén que codifica la recombinasa ERE fomentará la recombinación entre los dos sitios loxP. Los transcromosomas también pueden ser un cromosoma de fusión que consiste en diferentes fragmentos de cromosoma como resultado de la translocación descrita anteriormente. Los transcromosomas pueden ser autónomos. Los transcromosomas autónomos son distintos de, son no contiguos a y no se insertan en los cromosomas de ratón endógenos. Estos transcromosomas autónomos comprenden secuencias de telómero y centrómero que permiten la replicación autónoma. Alternativamente, secuencias de transcromosomas pueden ser translocadas a cromosomas de ratón después de la introducción en los núcleos de células de ratón. Los cromosomas de ratón endógenos incluyen 19 pares de cromosomas autosómicos y los cromosomas X e Y.

La introducción de loci de inmunoglobulina humana exógena se puede lograr mediante una diversidad de métodos que incluyen, por ejemplo, la microinyección pronúcleos de embriones de medio-día, la transfección de células madre embrionarias o la fusión de células madre embrionarias con esferoplastos de levadura o micronúcleos que comprende transcromosomas. Los mamíferos transgénicos resultantes de los procesos descritos anteriormente son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias componente de inmunoglobulina exógenas introducidas, y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar los genes de inmunoglobulina endógenos. La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle, p. ej., por Lonberg et al., documento WO 93/12227 (1993); patentes de EE.UU. N°s 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825, 5.545.806, *Nature* 48:1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, documentos WO 91/10741 (1991), WO 94/02602 (1993), WO 96/34096 (1995), WO 96/33735 (1996), WO 98/24893 (1997), patentes de EE.UU. N°s 5.939.598, 6.075.181, 6.114.598, Tomizuka, K. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:722-727, Tomizuka, K. et al., 1997, *Nature Genetics* 16:133-143, y Tomizuka, K., documentos WO 97/07671, WO 98/37757, WO 00/10383 y JP 2000-42074 (cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad para todos los fines). Son particularmente adecuados mamíferos no humanos transgénicos tales como roedores. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales, p. ej., mediante la fusión de células B de dichos mamíferos a líneas celulares inmortales adecuadas utilizando la tecnología de Kohler-Milstein convencional. También se puede acceder directamente a anticuerpos monoclonales a partir de células B individuales, aislados a partir del medio, utilizando la amplificación por PCR de las regiones V (Schradler et al., 1997, patente de EE.UU. N° 5.627.052). Alternativamente, se pueden utilizar preparaciones de células B clasificadas por FACs o enriquecidas de otra manera como una fuente de ARN o de ADN para la amplificación por PCR de secuencias de la región V. También pueden utilizarse métodos de visualización de fagos (descritos más adelante) para obtener secuencias de anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos inmunizados que comprenden loci de inmunoglobulina humana. Las secuencias de la región V del anticuerpo humano obtenidas por estos métodos se pueden utilizar entonces para generar anticuerpos intactos que conservan las características de unión de los anticuerpos originales parentales. Este proceso se describe más adelante.

Un enfoque adicional para obtener anticuerpos humanos es el rastreo de un banco de ADNc a partir de células de acuerdo con el protocolo general descrito por Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281. Células de este tipo pueden obtenerse de un ser humano inmunizado con el antígeno deseado, fragmentos, polipéptidos más largos que contienen el antígeno o fragmentos o anticuerpos anti-idiotípicos. Las células también pueden obtenerse a partir de animales no humanos transgénicos que expresan secuencias de inmunoglobulina humana. Los animales no humanos transgénicos pueden inmunizarse con un antígeno o una colección de antígenos. Los animales también pueden ser no inmunizados. Los segmentos que codifican la región V de las secuencias de ADNc se clonan a continuación en un vector de ADN que dirige la expresión de las regiones V del anticuerpo. Típicamente, las secuencias de la región V se amplifican específicamente mediante PCR antes de la clonación. También típicamente, las secuencias de la región V se clonan en un sitio dentro del vector de ADN que se construye de manera que la región V se expresa como una proteína de fusión. La colección de secuencias de la región V clonadas se utiliza entonces para generar un banco de expresión de las regiones V del anticuerpo. Para generar un banco de expresión, el vector de ADN que comprende las secuencias de la región V clonadas se utiliza para transformar células huésped eucariotas o procariotas. Además de las regiones V, el vector puede codificar opcionalmente la totalidad o parte de un genoma viral, y puede comprender secuencias de empaquetamiento virales. En algunos casos, el vector no comprende un genoma de virus entero, y el vector se utiliza entonces junto con un virus helper o secuencias de ADN de virus helper. Las regiones V de anticuerpo expresadas se encuentran en, o sobre la superficie de células transformadas, o partículas de virus de las células transformadas. Esta biblioteca de expresión, que comprende las células o partículas de virus, se utiliza entonces para identificar secuencias de la región V que codifican anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos reactivos con antígenos predeterminados. Para identificar estas secuencias de la región V, el banco de expresión se rastrea o se selecciona en cuanto a la reactividad de las regiones V expresadas con los antígenos predeterminados. Las células o partículas de virus que comprenden las secuencias de la región V clonadas, y que tiene las regiones V expresadas, se rastrean o se seleccionan mediante un método que identifica o enriquece células o partículas de virus que tienen regiones V reactivas (p. ej., asociación de unión o actividad catalítica) con un antígeno predeterminado. Por ejemplo, antígeno marcado de forma radiactiva

o fluorescente que luego se une a regiones V expresadas puede ser detectado y utilizado para identificar o clasificar células o partículas de virus. Antígeno unido a una matriz sólida o perla también puede utilizarse para seleccionar células o partículas de virus que tienen regiones V reactivas sobre la superficie. Las secuencias de la región V identificadas de esta manera a partir del banco de expresión se pueden utilizar a continuación para dirigir la expresión, en una célula huésped transformada, de un anticuerpo o fragmento del mismo, que tiene reactividad con el antígeno predeterminado. El protocolo descrito por Huse se hace más eficiente en combinación con la tecnología de visualización de fagos. Véase, p. ej., Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documento WO 92/01047, patentes de EE.UU. N°s 5.871.907, 5.858.657, 5.837.242, 5.733.743 y 5.565.332 (cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines). En estos métodos, se producen bancos de fagos en los cuales los miembros (paquetes de visualización) muestran diferentes anticuerpos en sus superficies exteriores. Los anticuerpos se visualizan, por lo general, como fragmentos Fv o Fab. Anticuerpos de visualización de fagos con una especificidad deseada pueden seleccionarse por enriquecimiento por afinidad para el antígeno o fragmento del mismo. Se puede utilizar la visualización de fagos combinada con animales no humanos transgénicos inmunizados que expresan genes de inmunoglobulina humana para obtener anticuerpos específicos de antígeno incluso cuando la respuesta inmune al antígeno es débil.

En una variación del método de visualización de fagos, se pueden producir anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Véase, por ejemplo, Winter, documento WO 92/20791. En este método, ya sea la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se utiliza como material de partida. Por ejemplo, si una región variable de cadena ligera se selecciona como material de partida, se construye un banco de fagos en el que los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada se obtienen a partir de un banco de regiones variables de cadena pesada humanas reordenadas. La región variable de la cadena pesada humana de este fago sirve entonces como un material de partida para la construcción de un banco de fagos adicional. En este banco, cada uno de los fagos muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir del primer banco de visualización) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen a partir de un banco de regiones variables de cadena ligera humanas reordenadas. De nuevo, se seleccionan los fagos que muestran una fuerte unión específica para el seleccionado. Anticuerpos artificiales que son similares a anticuerpos humanos se pueden obtener a partir de bancos de visualización de fagos que incorporan secuencias aleatorias o sintéticas, por ejemplo, en regiones CDR.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos pueden ser enlazadas a al menos una parte de una región constante humana mediante diversos métodos bien conocidos (véase, p. ej., Queen et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033 y documento WO 90/07861; estas referencias y las referencias citadas en las mismas se incorporan aquí como referencia para todos los fines). La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea un complemento dependiente de anticuerpo y/o una toxicidad mediada por células. Por ejemplo, los isotipos IgG₁ e IgG₃ suelen tener una mayor actividad de unión al complemento que los isotipos IgG₂ o IgG₄. La elección del isotipo también puede afectar al paso del anticuerpo en el cerebro. Regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en donde los dominios variables de cadena pesada y ligera están enlazados a través de un espaciador.

Para algunas aplicaciones, pueden ser útiles anticuerpos no IgG. Por ejemplo, en los casos en los que se desean complejos de anticuerpos multivalentes, se pueden utilizar anticuerpos IgM e IgA.

Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos se producen típicamente mediante expresión recombinante. Construcciones de polinucleótidos recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de la expresión enlazada operativamente a las secuencias codificadoras de cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones asociadas de forma natural o heterólogas de promotor. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped, ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, p. ej., resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

E. coli es un huésped procarionta particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente invención. Microbios, tales como levaduras, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, teniendo vectores adecuados secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias

de terminación y similares, según se desee. Promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

5 Células de mamíferos son un huésped preferido para la expresión de los segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, FROM GENES TO CLONES (VCH Publishers, Nueva York, 1987). Se ha desarrollado en la técnica un cierto número de líneas de células huésped adecuadas, capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células L y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células no son humanas. Vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., 1986, *Immunol. Rev.* 89:49), y sitios de información de procesamiento necesarios tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción.

15 Alternativamente, secuencias codificadoras de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la subsiguiente expresión en la leche del animal transgénico (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 5.741.957, 5.304.489, 5.849.992). Transgenes adecuados incluyen secuencias codificadoras para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operativo con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria tal como caseína o beta-lactoglobulina.

20 Los vectores que contienen segmentos de ADN de interés pueden transferirse en la célula huésped por métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus puede utilizarse para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase, en general, Sambrook et al., supra). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en oocitos fertilizados, o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células pueden ser transferidos a oocitos enucleados.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, incluyendo la purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

30 Un ejemplo de un método de preparar un anticuerpo policlonal recombinante es haciendo bancos de anticuerpos policlonales (PCAL), por ejemplo tal como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.789.208 (a J. Sharon), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

35 Más específicamente, el anticuerpo policlonal incluido en la composición farmacéutica se puede preparar mediante la inmunización de un animal, preferiblemente un mamífero, con un antígeno de elección, seguido por el aislamiento de linfocitos B productores de anticuerpos de la sangre, la médula ósea, los ganglios linfáticos o el bazo. Alternativamente, células productoras de anticuerpos se pueden aislar de un animal y se pueden exponer a un antígeno in vitro contra el cual se han de dirigir los anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos pueden entonces ser cultivadas para obtener una población de células productoras de anticuerpos, opcionalmente después de la fusión de una línea celular inmortalizada tal como un mieloma.

40 Un banco combinatorio se puede preparar a partir de linfocitos B inmunizados mediante la asociación de V_L y V_H al azar en un vector de clonación. Por lo tanto, el anticuerpo policlonal recombinante se genera en condiciones tales que los segmentos de genes de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina están enlazados entre sí al azar con el fin de permitir la transferencia masiva de pares de genes de la cadena ligera y de cadena pesada de la región variable de un vector a otro, al tiempo que permite el emparejamiento estable de segmentos de genes de la cadena ligera y de la cadena pesada de la región variable de inmunoglobulina específicos, ya que están presentes después de la selección de un banco parental de segmentos de genes de la cadena ligera y de la cadena pesada de la región variable de inmunoglobulina que codifican moléculas de anticuerpo capaces de reaccionar con, o unirse a un alérgeno.

50 Se puede utilizar una PCR de una sola célula en un intento de retener el emparejamiento nativo de V_L y V_H en la célula individual. En este caso, linfocitos B productores de anticuerpos que han sido aislados a partir de animales o seres humanos pueden fijarse con una disolución de fijación o una disolución que contiene un producto químico tal como formaldehído, glutaraldehído o similares. Las células se permeabilizan a continuación con una disolución de permeabilización que comprende, por ejemplo, un detergente tal como Brij, Tween, polisorbato, Triton X-100, o similares. El proceso de fijación y permeabilización debe proporcionar suficiente porosidad para permitir la entrada de enzimas, nucleótidos y otros reactivos en las células, sin la destrucción indebida de compartimentos celulares o ácidos nucleicos en la misma. La adición de enzimas y nucleótidos puede entonces entrar en las células para transcribir de forma inversa V_H y V_L de ARNm celular en las secuencias de ADNc correspondientes.

Tras la transcripción inversa, las secuencias de ADNc resultantes pueden ser amplificadas por PCR utilizando cebadores específicos para genes de inmunoglobulina y, en particular, para las regiones terminales de los ácidos nucleicos de V_H y V_L . Los procedimientos de PCR pueden ser seguidos como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N°. 4.683.195. Preferiblemente, los ADNc se amplifican por PCR y se enlazan en la misma reacción, utilizando, además de los cebadores de ADNc, un cebador para el extremo 5' del gen de la región V_H y otro para el extremo 5' del gen de V_L . Estos cebadores también contienen colas complementarias de secuencia extra para permitir el auto-ensamblaje de los genes V_H y V_L . Después de la amplificación por PCR y de la unión, la posibilidad de obtener productos mixtos, en otras palabras, regiones variables mixtas, es mínima debido a que las reacciones de amplificación y enlace se realizaron dentro de cada una de las células. Las secuencias amplificadas se enlazan por hibridación de secuencias terminales complementarias. Después del enlace, las secuencias pueden recuperarse de las células. Por ejemplo, después del enlace, las células pueden lavarse en una disolución de dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDS precipita de las células después de la incubación en hielo y el sobrenadante puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa o acrilamida. Alternativamente, o en combinación con el proceso de SDS, utilizando un reactivo tal como nucleótidos enlazados a digoxigenina, los productos de ADN sintetizados permanecerán dentro de la célula y serán amplificados. El producto enlazado se recupera tras la electroforesis del sobrenadante.

Después de la electroforesis del sobrenadante, se separa la rebanada de gel correspondiente al peso molecular apropiado del producto enlazado y el ADN se aísla, por ejemplo, en perlas de sílice. El ADN recuperado puede ser amplificado por PCR utilizando cebadores terminales, si es necesario, y se clona en vectores que pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, vectores virales o combinaciones de los mismos. Sitios de enzimas de restricción convenientes se pueden incorporar en las secuencias hibridadas para facilitar la clonación. Estos vectores también pueden guardarse como un banco de regiones variables enlazadas para su uso posterior.

Los genes de las regiones V_H y V_L enlazados pueden ser amplificados por PCR una segunda vez utilizando cebadores anidados terminales, proporcionando una población de fragmentos de ADN que codifican las regiones genéticas relacionadas V_H y V_L . El agrupamiento de combinaciones de V_H y V_L es una ventaja de este proceso y permite la transferencia en masa o en tandas de todos los clones y todos los fragmentos de ADN durante este y todos los procedimientos de clonación.

El anticuerpo policlonal recombinante se puede generar en condiciones tales que los segmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina están enlazados entre sí en una orientación de cabeza a cabeza, con el fin de permitir la transferencia masiva de los pares de la cadena ligera y la cadena pesada de la región variable de un vector a otro, incluyendo de fago a vector, y que incluye desde la célula de origen a fago o vector, dando como resultado un emparejamiento estable de los segmentos de genes de la cadena pesada y de la cadena ligera de la región variable de la inmunoglobulina específica tal como se encuentran en la respuesta inmune policlonal original del animal o individuo humano.

En ocasiones puede ser deseable tratar las secuencias de genes de la región variable con un agente mutante. Agentes mutantes crean mutaciones puntuales, huecos, deleciones o adiciones en la secuencia genética que puede ser general o específica, o al azar o dirigida al sitio. Agentes mutantes útiles incluyen luz ultravioleta, radiación gamma, productos químicos tales como bromuro de etidio, psoraleno y análogos de ácidos nucleicos, enzimas modificadoras del ADN tales como enzimas de restricción, transferasas, ligasas y nucleasas y polimerasas específicas y no específicas. Además de ello, puede ser factible utilizar cepas mutantes. En particular, mutaciones aleatorias pueden introducirse en las CDRs de los genes de la región V_H y V_L por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. Las mutaciones introducidas en la secuencia del gen aumentarán en última instancia la complejidad y diversidad del banco, así como la afinidad para el antígeno que puede aumentar aún más la utilidad del banco en el tratamiento. Además, una mutagénesis de este tipo puede utilizarse en un solo par de V_H y V_L o en un grupo definido de tales pares para generar un banco de novo.

Los vectores se transforman en células huésped adecuadas y los cultivos se amplifican para expandir las diferentes poblaciones de vectores que componen el banco. Células huésped para vectores procariotas pueden ser un cultivo de bacterias tales como *Escherichia coli*. Células huésped para vectores eucariotas pueden ser un cultivo de células eucariotas tales como cualesquiera líneas celulares de mamífero, de insecto o de levadura adaptadas a cultivo de tejidos. Las células bacterianas se transforman con vectores mediante choque térmico con cloruro de calcio o electroporación, aunque también serían aceptables muchos otros procesos de transformación. Las células eucariotas se transfectan con precipitación con fosfato cálcico o electroporación, aunque también serían aceptables muchos otros procedimientos de transformación. Los fragmentos de ADN pueden clonarse en vectores de expresión procariotas o eucariotas, vectores quiméricos o vectores dobles. El vector de expresión puede ser un plásmido, cósmido, fago, vector viral, fagémido y combinaciones de los mismos, pero preferiblemente es un vector de visualización de fagos en donde el producto recombinante se expresa en la superficie del fago para facilitar el rastreo y la selección. Sitios de transcripción y traducción útiles pueden ser colocados en el vector de expresión que incluye las regiones de reconocimiento de la ARN polimerasa tales como un sitio de caja TATA, un sitio CAT, un potenciador, sitios de corte y empalme apropiados, si es necesario, una región terminal rica en AT y un sitio de

5 iniciación de la transcripción. Sitios útiles para facilitar la traducción incluyen sitios de inicio y parada de la traducción y sitios de unión a ribosomas. Típicamente, algunos de los sitios más útiles para la expresión eucariota eficaz, tales como la región de promotor/potenciador de SV40, CMV, HSV o baculovirus se derivan de virus. El anticuerpo recombinante resultante puede ser de la clase murina IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgM, IgA, IgD o IgE, de las clases humanas IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD o IgE, o combinaciones o fragmentos de las mismas. Preferiblemente, el banco de anticuerpos quiméricos se compone principalmente de anticuerpos IgG o fragmentos de anticuerpos Fab.

Métodos de Tratamiento

10 Los métodos generalmente implican administrar a un sujeto mamífero en necesidad del mismo una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo objeto para la inclusión de métodos de reducir el nivel de un polipéptido generado después de la activación de la vía alternativa del complemento; métodos para reducir el nivel de complejo de ataque a la membrana (MAC); métodos para reducir el nivel de un anafilotoxina; métodos para reducir el nivel de C3b; y métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la vía alternativa del complemento.

15 Una "cantidad eficaz" o "terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo objeto es una cantidad que es eficaz para reducir la producción y/o el nivel de un polipéptido generado después de la activación de la vía alternativa del complemento en al menos aproximadamente 20%, en al menos aproximadamente 30%, en al menos aproximadamente 40%, en al menos aproximadamente 50%, en al menos aproximadamente 60%, en al menos aproximadamente 70%, en al menos aproximadamente 80%, en al menos aproximadamente 90%, o más.

20 El anticuerpo anti-properdina es administrado a un individuo en una formulación con un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables. Se conoce una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables en la técnica y no necesitan ser discutidos en detalle en esta memoria.

25 Los excipientes farmacéuticamente aceptables tales como vehículos, adyuvantes, soportes o diluyentes están disponibles al público. Además, están fácilmente disponibles al público sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tales como agentes ajustadores del pH y tampón, agentes ajustadores de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares.

30 En los métodos objeto, un anticuerpo objeto se puede administrar al huésped utilizando cualquier medio conveniente capaz de resultar en el efecto terapéutico deseado. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser incorporado en una diversidad de formulaciones para la administración terapéutica. Más particularmente, un anticuerpo objeto se puede formular en composiciones farmacéuticas por combinación con apropiados soportes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y se puede formular en preparados en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles.

Como tal, la administración de un anticuerpo objeto se puede lograr de varias maneras, incluyendo la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intranasal, pulmonar, intratraqueal, etc.

35 En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden utilizarse solos o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son meramente ilustrativos y no son en modo alguno limitativos.

40 Un anticuerpo objeto se puede formular en preparados para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionando el mismo en un disolvente acuoso o no acuoso tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

45 Formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el o los inhibidores en una composición como una disolución en agua estéril, solución salina normal u otro soporte farmacéuticamente aceptable.

50 La expresión "forma de dosificación unitaria", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada una de las unidades una cantidad predeterminada de un anticuerpo objeto calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un anticuerpo objeto se administra a un individuo a una frecuencia y durante un período de tiempo con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, un anticuerpo objeto se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qow), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tqw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, en días alternos (qod), diario (qd), dos veces al día (qid), o tres veces al día (tid), o sustancialmente de forma continua, o de forma continua, durante un período de tiempo que oscila entre aproximadamente un día y aproximadamente una semana, de aproximadamente dos semanas a aproximadamente cuatro semanas, de aproximadamente un mes a aproximadamente dos meses, de aproximadamente dos meses a aproximadamente cuatro meses, de aproximadamente cuatro meses a aproximadamente seis meses, o más.

10 **Terapia de Combinación**

El anticuerpo anti-properidina se administrará en algunas realizaciones en una cantidad eficaz en la terapia de combinación con un segundo agente terapéutico. Segundos agentes terapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes anti-inflamatorios; agentes utilizados para el tratamiento de trastornos cardiovasculares; agentes anti-inflamatorios esteroides; y similares.

15 Agentes anti-inflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a los fármacos anti-inflamatorios no esteroides (AINE) acetaminofeno, salicilato, ácido acetyl-salicílico (aspirina, diflunisal), ibuprofeno, Motrin, Naprosyn, Nalfon y Trilisate, indometacina, glucametacina, acemetacina, sulindac, naproxeno, piroxicam, diclofenaco, benoxaprofeno, ketoprofeno, oxaprozina, etodolac, ketorolac trometamina, ketorolac, nabumetona, y similares, y mezclas de dos o más de los anteriores. Otros agentes anti-inflamatorios adecuados incluyen metotrexato.

20 Agentes anti-inflamatorios esteroides adecuados incluyen, pero no se limitan a hidrocortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona y triamcinolona.

Ejemplos de agentes para indicaciones cardiovasculares incluyen inhibidores de GP IIb-IIIa tales como INTEGRILIN (eptifibatida); aprotinina; REOPRO (abciximab); y similares.

25 Segundos agentes terapéuticos adecuados incluyen beta-adrenérgicos que incluyen broncodilatadores incluyendo albuterol, sulfato de isoproterenol, sulfato de metaproterenol, sulfato de terbutalina, acetato de pirbuterol y formotorol salmeterol; esteroides incluyendo dipropionato de beclometasona, flunisolida, fluticasona, budesonida y acetónido de triamcinolona. Fármacos antiinflamatorios utilizados en relación con el tratamiento de enfermedades respiratorias incluyen esteroides tales como dipropionato de beclometasona, triamcinolona, flunisolida y fluticasona. Otros ejemplos de fármacos anti-inflamatorios incluyen cromoglicatos tales como cromoglicato sódico. Otros fármacos respiratorios, que calificarían como broncodilatadores, incluyen anticolinérgicos, incluyendo bromuro de ipratropio. Antihistamínicos incluyen, pero no se limitan a difenhidramina, carbinoxamina, clemastina, dimenhidrinato, pririlamina, tripelnamina, clorfeniramina, bromfeniramina, hidroxizina, ciclizina, meclizina, clorciclizina, prometazina, doxilamina, loratadina y terfenadina. Antihistamínicos particulares incluyen rhinolast (Astelin), claratyne (Claritin), claratyne D (Claritin D), telfast (Allegra), zyrtec y beconase.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-properidina se administra simultáneamente con un segundo agente terapéutico. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "simultáneamente" indica que el anticuerpo objeto y el segundo agente terapéutico se administran por separado y se administran en el espacio de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 15 segundos, en el espacio de aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 30 segundos, en el espacio de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 segundos, en el espacio de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos, en el espacio de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 15 minutos, en el espacio de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 30 minutos, en el espacio de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, en el espacio de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, en el espacio de aproximadamente 2 hora a aproximadamente 6 horas, en el espacio de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas, en el espacio de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas o en el espacio de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas uno del otro.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-properidina se administra durante todo el curso del tratamiento con el segundo agente terapéutico. En otras realizaciones, un anticuerpo objeto se administra durante un período de tiempo que se solapa con el del tratamiento con el segundo agente terapéutico, p. ej., el tratamiento con el anticuerpo puede comenzar antes de que comience el tratamiento con el segundo agente terapéutico y terminar antes de que termine el tratamiento con el segundo agente terapéutico; el tratamiento con el anticuerpo puede comenzar después de que comience el tratamiento con el segundo agente terapéutico y terminar después de que termine el tratamiento con el anticuerpo; el tratamiento con el anticuerpo puede comenzar después de que comience el tratamiento con el segundo agente terapéutico y terminar antes de que termine el tratamiento con el segundo agente terapéutico; o el tratamiento con el anticuerpo puede comenzar antes de que comience el tratamiento con el segundo agente terapéutico y terminar después de que termine tratamiento con el segundo agente terapéutico.

Sujetos para el Tratamiento

Los sujetos que pueden ser tratados con un método objeto incluyen individuos que padecen uno o más de los siguientes trastornos: aterosclerosis, isquemia-reperusión después de un infarto de miocardio agudo, nefritis púrpura de Henoch Schonlein, vasculitis compleja inmune, artritis reumatoide, arteritis, aneurisma, accidente cerebrovascular, cardiomiopatía, choque hemorrágico, lesión por aplastamiento, insuficiencia orgánica múltiple, choque hipovolémico e isquemia intestinal, rechazo de trasplantes, cirugía cardíaca, PTCA, aborto espontáneo, lesión neuronal, lesión de la médula espinal, miastenia grave, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión, lesión pulmonar aguda, enfermedad de Goodpasture, infarto de miocardio, inflamación de baipás post-cardiopulmonar, baipás cardiopulmonar, choque séptico, rechazo de trasplantes, xenotrasplante, lesiones por quemaduras, lupus eritematoso sistémico, nefritis membranosa, enfermedad de Berger, psoriasis, penfigoide, dermatomiositis, síndrome anti-fosfolípido, enfermedad inflamatoria del intestino, hemodiálisis, leucoféresis, plasmaféresis, precipitación LDL de oxigenación de la membrana extracorpórea inducida por heparina, oxigenación por membrana extracorpórea y degeneración macular.

En un aspecto particular de la invención, los sujetos que se puede tratar con un método objeto incluirán los individuos que padecen de uno o más de los siguientes trastornos: inflamación de baipás post-cardiopulmonar, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), choque séptico, rechazo de trasplantes, lesiones por quemaduras, esclerosis múltiple, miastenia grave, trastornos cardiovasculares y artritis reumatoide. Sujetos adecuados para el tratamiento con un método en cuestión incluyen también individuos que padecen algún trastorno inflamatorio, incluyendo, pero no limitado a lupus eritematoso sistémico, nefritis membranosa, penfigoide, dermatomiositis y síndrome antifosfolípido. Sujetos adecuados para el tratamiento también incluyen sujetos sometidos a diálisis renal.

Incorporación por Referencia

Todas las referencias citadas en esta memoria, incluidas las patentes, solicitudes de patente, artículos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en los mismos, en la medida en que lo no estén ya, se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Además, las siguientes referencias también se incorporan aquí como referencia en su totalidad, incluyendo las referencias citadas en tales referencias:

La descripción que antecede y los Ejemplos detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los autores de la invención. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado que pueda aparecer lo anterior en el texto, la invención puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera equivalentes de las mismas.

EJEMPLOS

Si no se indica lo contrario, todos los reactivos eran ultrapuros. Los péptidos pequeños, péptidos TSR5 y péptidos TSR6 fueron sintetizados por la facilidad de la base de Cleveland Clinic Foundation. Todos los reactivos del complemento eran de Advanced Research Technologies, San Diego, CA, ahora Complementech, Tylar de Texas o de Quidel Corporation, San Diego, CA. GVB para la vía clásica, solución salina tamponada con fosfato fue adquirida de Sigma-Aldrich, St Louise MO, GVB por vía alternativa del complemento fue adquirido de Complementech, Tylar, TX, Todos los anticuerpos de citometría de flujo eran de BD Biosciences, San Jose, CA, sustrato TMB era de Kirkegaard & Perry Limited, Gaithersberg, MD, rRBC y eritrocitos de oveja (sensibilizados para el anticuerpo) eran de Complementech, Tylar, TX, Todos los anticuerpos secundarios eran de American Qualex, San Clemente, CA, BSA y otros reactivos eran todos de Sigma-Aldrich, St. Louise, MO. Suero humano normal estaba recién aislado utilizando tubos BD Biosciences Clotting.

Lectores de placas ELISA (SpectraMax 190 y 250) eran de Molecular Devices, y el citómetro de flujo era FACSCalibur. Se utilizó el Programa Varsity 3D para los análisis de datos. Los ajustes de curvas se realizaron utilizando el programa MicroCal Origin. El ensayo cinético de la hemólisis se realizó utilizando SectraMax, Molecular Devices. Placas de ELISA eran de Corning Costar, Lowell, MA.

F(ab)₂ se utilizó para el modelo de circulación extracorpórea. El MoAb⁽⁷¹⁻¹¹⁰⁾ se digirió con Ficin para producir F(ab)₂ utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

EJEMPLO 1**El Péptido CRSPRWLSWS (SEQ ID NO: 4) Properdina inhibe la Activación por Vía Alternativa**

El péptido CRSPRWLWS (SEQ ID NO: 4) está situado dentro del segmento N-terminal de properdina que conecta el extremo N a TSR1 (SEQ ID NO: 1). Debido al pequeño tamaño del péptido, éste no tendrá la conformación de la molécula nativa y, por lo tanto, se espera que tenga una afinidad más pobre en comparación con la properdina nativa. Properdina no une C3, sólo une C3b. C3 contiene C3a y C3b no sólo C3b sola y podría funcionar de manera diferente a C3b. En este experimento, se sometió a ensayo la inhibición por parte del péptido de la unión de properdina a C3b. También se determinó si el péptido también inhibiría la formación de MAC (9-C5b) porque la formación de MAC demuestra la finalización de la cascada.

Ensayo de Formación de C5b-9: Los pocillos de microtitulación se recubrieron con LPS (2 µg/50 µl por pocillo) en PBS durante la noche a 4°C. Pocillos sin revestir sirvieron como controles de fondo. Después de aspirar la disolución de LPS, los pocillos se trataron con BSA al 1% en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS) durante 2 horas. Tras una incubación de 2 horas, los pocillos se enjuagaron con PBS y se incubaron con diversas concentraciones de los péptidos en tampón AP que contiene suero humano normal (NHS) al 10%. Después de una incubación de 2 horas a 37°C para permitir que se produzca la activación de AP, se detectó el MAC (C5b-9) depositado con anticuerpo monoclonal neo-C5b-9 soluble anti-humano de ratón diluido en la relación 1:2000. Todas las diluciones del anticuerpo monoclonal se hicieron en disolución de bloqueo y todas las incubaciones de anticuerpos se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se detectó con monoclonal anti ratón de cabra (A2304, Sigma Chemical). Después de cada una de las incubaciones, la placa se lavó cinco veces con PBS. La placa se desarrolló con TMB y la reacción de color azul se inactivó con ácido fosfórico 1M.

Ensayo de unión de properdina-C3b: Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con la proteína C3b (1,0 µg/50 µl por pocillo) en PBS (siglas inglesas de solución salina tamponada con fosfato) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la proteína C3b, los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de C3b sirvieron como controles de fondo. Pocillos revestidos con C3b se incubaron con properdina 5 nM que contiene diversas concentraciones del péptido sintético CRSPRWLWS (SEQ ID NO: 4) (Advanced Research Technology, San Diego, CA) en disolución de bloqueo. Las muestras se añadieron a los pocillos. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron cinco veces con PBS. Properdina unida a C3b se midió mediante la adición de anticuerpo de properdina monoclonal anti-humano P#2 a una dilución de 1:2000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1: 2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato TMB. La reacción de color azul de TMB se inactivó mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

La Fig. 5 muestra que el péptido CRSPRWLWS (SEQ ID NO: 4) inhibe la formación de MAC de una manera dependiente de la dosis, alcanzándose una inhibición casi completa en 60-100 µg/ml del péptido. La Fig. 6 muestra que el mismo péptido también es eficaz en la inhibición de la unión de properdina a C3b. La justificación de la gran concentración de péptido necesaria para inhibir es el hecho de que estos péptidos son muy pequeños en longitud y no poseen la conformación nativa de la proteína original, por lo que se requiere un exceso de péptido para observar los efectos inhibitorios. Otro péptido tomado de una zona de la secuencia de properdina no inhibe la unión de properdina a C3b (Fig 7). Los autores de la invención han demostrado que la unión de properdina a C3b no puede competir con C3 nativa (observación no publicada). Estos dos mismos péptidos demostraron inhibir la unión de properdina a C3 que contiene tanto el dominio C3a como el dominio C3b. La diferencia observada en estos estudios y en los estudios anteriores puede ser la C3 que se utiliza en oposición a la C3b utilizada en estos experimentos.

Ejemplo 2

El Péptido RYRRCVGWNG (SEQ ID NO: 5) de Properdina Inhibe la Activación de la Vía Alternativa

El péptido RYRRCVGWNG (SEQ ID NO: 5) está situado dentro del segmento N-terminal de TSR1, este es el mismo segmento que fue demostrado previamente que no tenía actividad inhibitoria en el ensayo de activación de AP. Los autores de la invención han demostrado que la unión de properdina a C3b es independiente de iones y puede ocurrir en EDTA. Los presentes experimentos se llevaron a cabo en disolución de bloqueo que no contiene Mg ni Ni. También han sometido a ensayo los cinco péptidos mostrados anteriormente como inhibidores en el ensayo de unión P-C3. De los cinco, sólo dos péptidos eran específicos para la unión properdina-C3b. Los otros tres no tuvieron efecto alguno sobre la unión a C3b o la activación AP. El péptido CRSPRWLWS (SEQ ID NO: 4) ha sido discutido en el Ejemplo 1 y el segundo péptido RYRRCVGWNG (SEQ ID NO: 5) se está discutiendo aquí en el Ejemplo 2. Este péptido RYRRCVGWNG (SEQ ID NO: 5) representa el segmento de properdina que conecta la región N-terminal a TSR1. Debido al pequeño tamaño del péptido, no tendrá la conformación de la molécula nativa y, por lo tanto, se espera que tenga la afinidad más pobre en comparación con la properdina nativa. Properdina no une C3, sólo une C3b. C3 contiene C3a y C3b no sólo C3b sola y podría funcionar de manera diferente a C3b. En este experimento, los autores de la invención sometieron a ensayo la inhibición de la unión de properdina a C3b por parte del péptido. También determinaron si el péptido también inhibiría la formación de MAC (9-C5b) porque la formación de MAC demuestra la finalización de la cascada.

Ensayo de Formación de C5b-9: Pocillos de microtitulación se recubrieron con LPS (2 µg/50 pocillo superior) en PBS durante la noche a 4°C. Pocillos sin revestir sirvieron como controles de fondo. Después de aspirar la disolución de LPS, los pocillos se trataron con BSA al 1% en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS) durante 2 horas. Tras una incubación de 2 horas, los pocillos se enjuagaron con PBS y se incubaron con diversas concentraciones de los péptidos en tampón AP que contiene suero humano normal (NHS) al 10%. Después de una incubación durante 2 horas a 37°C para permitir que se produzca la activación de AP, se detectó el MAC (C5b-9) depositado con anticuerpo monoclonal neo-C5b-9 soluble anti-humano de ratón diluido en la relación 1:2000. Todas las diluciones del anticuerpo monoclonal se hicieron en disolución de bloqueo y todas las incubaciones de anticuerpos se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se detectó con monoclonal anti ratón de cabra. Después de cada una de las incubaciones, la placa se lavó cinco veces con PBS. La placa se desarrolló con TMB y la reacción de color azul se inactivó con ácido fosfórico 1M.

Ensayo de unión de properdina-C3b: Placas de microtitulación de poliestireno (Corning, Cat.) se recubrieron con la proteína C3b (1,0 µg/50 µl por pocillo) en PBS (solución salina tamponada con fosfato) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la proteína C3b, los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de C3b sirvieron como controles de fondo. Pocillos revestidos con C3b se incubaron con properdina 5 nM que contiene diversas concentraciones del péptido sintético CRSPRWLSWS (Advanced Research Technology, San Diego, CA) en disolución de bloqueo. Las muestras se añadieron a los pocillos. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron cinco veces con PBS. Properdina unida a C3b se midió mediante la adición de anticuerpo monoclonal de properdina anti-humano P#2 a una dilución de 1:2000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1: 2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato TMB. La reacción de color azul de TMB se inactivó mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

La Fig. 7 muestra que el péptido RYRRCVGWNG (SEQ ID NO: 5) inhibe la formación de MAC de una manera dependiente de la dosis, con una IC₅₀ de casi 50 µg/ml, no se sometieron a ensayo concentraciones mayores. La Fig. 8 muestra que el mismo péptido también es eficaz en la inhibición de la unión de properdina a C3b. La justificación de la gran concentración de péptido necesaria para inhibir es el hecho de que estos péptidos son muy pequeños en longitud y no poseen la conformación nativa de la proteína original, por lo que se requiere un exceso de péptido para observar los efectos inhibitorios. Otro péptido tomado de una zona de la secuencia de properdina no inhibe la unión de properdina a C3b. Tomados en conjunto, el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 demuestran que sólo dos péptidos inhiben específicamente la unión de properdina a C3b de una manera dependiente de la dosis y claramente sugieren que es el segmento⁷¹⁻¹¹⁰ el que puede estar implicado en la activación de AP.

Ejemplo 3

35 **El Péptido (LCQPCRSRWLSLWSTWAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVGWNGQ) (SEQ ID NO: 2) de Properdina Inhibe la Activación de la Vía Alternativa en la Hemólisis de Eritrocitos de Conejo**

Se ensambló un péptido (⁷¹⁻¹¹⁰) que contiene los dos péptidos pequeños mostrados en los Ejemplos 1 y 2. La justificación para sintetizar el péptido era los resultados obtenidos en los dos péptidos. Los autores de la invención postularon que el péptido sintético Péptido (⁷¹⁻¹¹⁰) podría inhibir la activación de AP de unir properdina a C3b. También sintetizaron péptidos adicionales correspondientes a TSR5 y TSR6. Todos los tres péptidos se evaluaron en un ensayo de C5b-9 dependiente de la vía alternativa y un ensayo de unión de properdina a C3b. En estos ensayos utilizaron ensayos C5b-9 basados en células en lugar de ensayo de activación de AP basados en LPS, puramente debido a la conveniencia.

Los eritrocitos inician la cascada alternativa del complemento en suero humano, y la formación resultante de MAC provoca la lisis de estas células. Si properdina es esencial para la actividad de la vía alternativa, entonces la adición del péptido de bloqueo L-G a eritrocitos de conejo bañados en suero humano debería impedir la lisis celular. Esto puede someterse a ensayo examinando la dispersión de la luz provocada por los glóbulos rojos intactos; las células lisadas no difractan la luz, y hay una consiguiente reducción de la luz dispersada. Está bien establecido que los eritrocitos de conejo activan específicamente la vía alternativa del complemento, con una lisis resultante de las células por el complejo C5b-9. El péptido TSR-1 a diversas concentraciones en tampón de gelatina Veronal (Complement Technology) con MgCl₂ 10 mM y EGTA 10 mM, se incubó con 37°C con un número fijo de eritrocitos de conejo (Covance) y con suero humano normal al 10%. Una disminución progresiva de la dispersión de luz (debido a la lisis de células intactas) se midió a 700 nm como una función del tiempo en un lector de placas ELISA controlado en temperatura. Los datos se registraron y analizaron con un lector de placas SpectraMax 190 y el software SoftMax Pro y los resultados se representaron con el software MicroCal Origin.

Ensayo de unión de properdina-C3b: Placas de microtitulación de poliestireno (Corning, Cat.) se recubrieron con proteína C3b (1,0 µg/50 µl por pocillo) en PBS (solución salina tamponada con fosfato) durante la noche a 4°C.

Después de aspirar la proteína C3b, los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de C3b sirvieron como controles de fondo. Pocillos recubiertos con C3b se incubaron con properdina 5 nM que contiene diversas concentraciones del péptido sintético LCQPCRSRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVGNQ (SEQ ID NO: 2) en disolución de bloqueo. Las muestras se añadieron a los pocillos. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron cinco veces con PBS. La properdina unida a C3b se midió mediante la adición de anticuerpo monoclonal de properdina anti-humano P#2 en dilución 1: 2000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato TMB. La reacción de color azul de TMB se inactivó mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

La Fig. 9 muestra que la secuencia combinada inhibe la formación de C5b-9 (activación AP) en un ensayo de rRBC. La ausencia de inhibición completa por parte del péptido en gran parte puede ser debida a la concentración del péptido y a que el péptido no está en una conformación correcta. El hecho de que el péptido grande inhibía la hemólisis de rRBC de una manera dependiente de la dosis sugiere claramente que es este segmento del péptido que es el responsable de gran parte de la unión. Los péptidos TSR5 y TSR6 no demostraron inhibición alguna de la formación de C5b-9.

La Fig. 10 muestra que el péptido inhibe la unión de properdina a C3b. Estos datos están en perfecto acuerdo con los presentados en la Fig. 7. Por lo tanto, es claro que el mecanismo de la activación de AP por parte de properdina reside en diversos dominios de la molécula de properdina nativa. Los autores de la invención descubrieron que el dominio parece ser único para desarrollar agentes que inhibirían la función de properdina.

Ejemplo 4

Identificación de MoAb que Une el Péptido⁷¹⁻¹¹⁰ LCQPCRSRWSLWS TWAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVGNQ (SEQ ID NO: 2) Péptido Identificado en el Ejemplo 2.

Como se ha señalado a lo largo de esta solicitud de patente, se pueden preparar varios anticuerpos monoclonales anti-properdina que bloquean la activación de AP a través de diferentes mecanismos. Anticuerpos monoclonales anti-properdina se generaron utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Clones de anticuerpos que se unen específicamente al péptido⁷¹⁻¹¹⁰ fueron seleccionados utilizando el ensayo ELISA.

Ensayo de Rastreo: Placas de microtitulación se recubrieron con péptido⁷¹⁻¹¹⁰ (2,0 µg/50 µl por pocillo), péptidos TSR5 y TSR6 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Después de aspirar las disoluciones de péptidos, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de péptidos sirvieron como controles de fondo. Se añadieron partes alícuotas de anticuerpos anti-properdina monoclonales en disolución de bloqueo y las placas se dejaron incubar durante 1 hora a los pocillos recubiertos de péptidos para permitir la unión del anticuerpo al péptido. La placa se enjuagó con PBS y la unión de los anticuerpos monoclonales anti-properdina se detectó en dilución 1:2000 de anti-ratón de cabra secundario marcado con HRPO a una dilución 1:2000 en disolución de BSA al 1%. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se desarrolló utilizando métodos ELISA estándares descritos anteriormente.

La Fig. 11 muestra que un clon de anticuerpo anti-properdina une el péptido⁷¹⁻¹¹⁰ pero no TSR5 y TSR6. El clon de anticuerpo seleccionado MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ se cultivó a granel y se purificaron anticuerpos anti-properdina que se unen a L-G. Los anticuerpos monoclonales que unen la región son los anticuerpos de esta invención. Estos anticuerpos monoclonales no unen los TSR5 y TSR6 utilizados en estos experimentos.

Ejemplo 5

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Une Properdina Humana con Alta Afinidad.

La afinidad de Moab⁷¹⁻¹¹⁰ al péptido⁷¹⁻¹¹⁰ es una afinidad de unión moderada. Una explicación razonable de una unión de este tipo es que el péptido no puede plegarse correctamente. Los autores de la invención sometieron a ensayo la afinidad de unión del clon MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a la proteína properdina nativa.

Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con properdina humana (2,0 µg/50 µl por pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la disolución de properdina, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de péptidos sirvieron como controles de fondo. Se añadieron partes alícuotas del clon de anticuerpos anti-properdina monoclonales MoAb⁷¹⁻¹¹⁰

en disolución de bloqueo a los pocillos revestidos con properdina y se dejaron incubar durante 1 hora para permitir que se produjera la unión. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, la placa se lavó con PBS cinco veces y se incubaron con anticuerpo policlonal anti-properdina diluido en la relación 1:2000.

- 5 Tal como se muestra en la Fig. 12, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ une properdina con alta afinidad. Estos valores de afinidad son más altos que los observados para el péptido⁷¹⁻¹¹⁰, probablemente porque el péptido es pequeño y no se puede plegar correctamente como la properdina nativa. Se sabe que los péptidos pueden no adoptar la conformación original.

Ejemplo 6

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ No Inhibe la Activación de la Vía Clásica

- 10 El anticuerpo monoclonal de la presente invención es diferente de los previamente descubiertos. Estos anticuerpos monoclonales no inhiben la vía clásica que es importante para la defensa del huésped. Eritrocitos de oveja sensibilizados a anticuerpos se incuban con suero humano normal en GVB, tampón CP. El complejo antígeno-anticuerpo en la superficie de las células de oveja activa la vía clásica del complemento. Como resultado se produce una lisis de eritrocitos. La activación de la vía clásica se produce en baja concentración de suero. Los autores de la invención sometieron a ensayo suero humano normal al 1% y 10%. Se utilizó la mayor concentración de suero
15 porque querían preservar el bucle de amplificación.

En un ensayo típico, los eritrocitos se incuban en suero humano normal al 1% en tampón CP para permitir que se produzca la activación del complemento. Como resultado de la activación de CP, C5b-9 se forma en la superficie de los eritrocitos provocando la lisis celular. La disminución progresiva de la dispersión de la luz se mide a 700 nm como una función del tiempo.

- 20 Tal como se muestra en la Fig. 13, el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la activación de la vía clásica del complemento. Estos resultados sorprendentes sugieren, además, que se pueden preparar anticuerpos que inhiban específicamente la prevención de activación de AP sin afectar a la vía clásica. Anticuerpos monoclonales descubiertos previamente contra properdina son desconocidos para inhibir las dos vías de activación. El desarrollo de anticuerpos monoclonales de esta invención dejará la vía clásica intacta para la defensa del huésped contra la infección.

Ejemplo 7

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Lisis de Eritrocitos de Conejo de la Vía Alternativa

- Este ensayo celular se basa en la formación del complejo terminal del complemento en la superficie de rRBC. Como resultado, los rRBC se lisan. La evidencia de células lisadas se refleja en la disminución progresiva de la dispersión de la luz a 700 nm. rRBC se incuban en suero humano normal en tampón AP. La superficie de rRBC desencadena
30 la activación de AP en suero humano normal. La cascada de AP comienza y conduce a la formación del complejo C5b-9 en la superficie de los rRBC. Se espera que los agentes que inhiben la activación inhiban la lisis celular.

- Para evaluar el efecto de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la activación de AP, diversas concentraciones de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en tampón AP se incubaron con suero humano normal (NHS al 10%) a 37°C con un número fijo de eritrocitos de conejo (Covance) en un lector de placas ELISA controlado en temperatura, capaz de leer a 700 nm. Una disminución progresiva de la dispersión de luz (debido a la lisis de células intactas) se midió a 700 nm como una función del tiempo. Los datos se registraron y analizaron con un lector de placas SpectraMax 190 y el software SoftMax Pro. Para el cálculo se calculó la inhibición total a cada una de las concentraciones de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ y los resultados se expresaron como % de los controles no lisados. Los datos en cada una de las concentraciones se representan en una gráfica sigmoidal con el software MicroCal Origin.

- 40 La Fig. 14 demuestra la potente actividad de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la inhibición de la lisis de eritrocitos. El anticuerpo es capaz de inhibir la lisis con una CI50 de aproximadamente 10 nM. Como se muestra en la Fig. 15, los trazados originales de SpectraMax demuestran que el anticuerpo inhibe la lisis de una manera dependiente de la dosis. Se tomaron los datos de cada uno de los gráficos en el punto final y se calculó el % de inhibición de hemólisis. Estos datos reflejan los datos generados utilizando gráficos in vitro mostrados en los Ejemplos (2 a 6).

Ejemplo 8

MoAb⁷⁷⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de AP en una Relación de Anticuerpos a Properdina de 1:1

Este experimento fue diseñado para determinar la cantidad de anticuerpo necesaria para inhibir la activación de AP. Se evaluaron tres muestras de suero de donantes para obtener datos estadísticamente significativos. Para cada uno de los sueros del donante, las suposiciones se hicieron en base a la concentración de properdina presente en el

siero. La sangre entera contiene properdina 200 nM. Basado en el hematocrito de aproximadamente 50%, el suero debería contener properdina 400 nM. Por lo tanto, las muestras de suero utilizadas contienen properdina 400 nM para cada uno de los tres donantes. La hemólisis se llevó a cabo en una concentración final de suero de properdina 100 nM, 50 nM, 40 nM y 30 nM.

- 5 Correspondientemente a cada concentración de suero, se sometieron a ensayo diversas concentraciones de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ para determinar la inhibición de la activación de AP utilizando el ensayo de lisis de rRBC. A cada una de las concentraciones de suero, se generó la curva de dosis con el anticuerpo de bloqueo. La IC₅₀ de la inhibición se calculó y se representó frente a la concentración en suero. Los datos se ajustaron utilizando un análisis lineal.

10 La Fig. 16 demuestra una relación lineal de la cantidad de anticuerpos y la concentración de properdina presente en el suero. El análisis de ajuste lineal demuestra que la pendiente de la línea es de aproximadamente 1,00, lo que indica que la relación de unión de anticuerpo a properdina es una relación 0,5:1, 1:1, 1,5:1.

Ejemplo 9

Factor B Une preferentemente C3b Unida a Properdina

15 Se sabe que el Factor B une C3b. También se sabe que la properdina une C3b y que convertasa C3 (PC3bBb) se estabiliza en presencia de properdina. Se ha debatido si properdina se une primero o sólo viene después de que ya se ha formado la convertasa C3bBb. Los autores de la invención evaluaron la unión de B a C3b y C3b unida a properdina utilizando ensayos de unión basados en ELISA. Se sabe que si la activación de AP no prosigue, C3b comienza a degradarse por la acción de factores H e I en iC3b, C3c y C3dg. La conversión de C3b en fragmentos más pequeños es indicativa de la vía de degradación de C3b. Se supone que en un sistema dado en un momento
20 dado, podrían existir algunos componentes C3b degradados. Los autores de la invención evaluaron si B unía C3b y PC3b con diferentes afinidades. También evaluaron la unión de iC3b, C3c y C3dg para el factor B en presencia y ausencia de properdina.

25 Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con C3b, iC3b, C3c o C3dg humano (1,0 µg/50 µl por pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una noche a 4°C. Después de aspirar la proteína, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento sirvieron como controles de fondo. En las placas sin properdina, se añadieron partes alícuotas de factor B en concentraciones variables en tampón AP y las placas se dejaron incubar durante 2 horas. La unión de factor B a la C3b y sus fragmentos se midió mediante la adición de anticuerpo de detección (Quidel, San Diego, CA, anticuerpo Bb de factor anti-humano) a una dilución 1:2000 en disolución de bloqueo. La
30 placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB). Después de la incubación durante 30 minutos a 25°C, la reacción de TMB se inactivó mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

35 En un experimento separado para evaluar el efecto de la presencia de properdina, una parte alícuota de properdina 5 nM se incubó durante 1 hora en disolución de bloqueo en placas recubiertas de C3b. Tras el lavado cinco veces con PBS, se añadieron diversas concentraciones de factor B como anteriormente y el resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

40 La Fig. 17 demuestra que el factor B une C3b unida a properdina con alta afinidad en comparación con C3b que no tiene unión de properdina. Se observó que la diferencia en la afinidad era 20 veces más alta que C3b unida a properdina, la afinidad de properdina a C3b es 1,11 nM. La afinidad de factor B a C3b es de alrededor de 20-30 nM. La afinidad de factor B se mejora cuando está presente factor P. También se evaluó si el factor B unía properdina directamente. Está claro a partir de los experimentos de unión directa que el factor B no une properdina. La falta de unión está en contraposición con los resultados de Farries et al. Estos experimentos utilizaron electroforesis en gel y un enlazador sintético artificial para determinar la unión, lo que podría generar algunos artefactos. Se evaluó la capacidad de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ de inhibir la unión de properdina a complejo de C3bB. Factor B une preferentemente C3b y C3b unida a properdina y muestra absolutamente poco o nada de unión a productos de degradación de C3b. Por lo tanto, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ sería preferentemente inhibir la unión de complejo C3bB unido a properdina. Properdina une C3b, iC3b, C3c, pero no une C3dg tal como se muestra en la Fig. 18. Por el contrario, el factor B sólo une C3b, pero no muestra unión alguna a C3b, iC3b, C3c, C3dg tal como se muestra en la Fig. 19. La falta de unión a factor B a todos estos fragmentos C3b junto con la afinidad de properdina es alta para el complejo C3b+B explica la unión preferencial y la activación de la convertasa C3 por el complejo trimolecular de alta afinidad (PC3bB). La inhibición de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ de la unión de properdina al complejo C3bB es importante en lugar de C3b sola.

Ejemplo 10

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la unión de P a C3b y C3bB

Este ensayo demuestra que el anticuerpo de esta invención es capaz de inhibir la unión de properdina exógena a C3b y el complejo C3bB.

5 Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con C3b humana (1,0 µg/50 µl por pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la proteína, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, N° de Cat. A7888) durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento de péptidos o properdina sirvieron como controles de fondo. Se añadieron partes alícuotas del anticuerpo a concentraciones variables en tampón AP que contiene properdina 50 nM y las placas se dejaron incubar durante 1 hora. La properdina unida a C3b se midió añadiendo anticuerpo de detección anticuerpo policlonal anti-properdina humana a diluciones 1:2.000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1: 2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB). Después de la incubación durante 30 minutos a 25°C, la reacción de TMB se inactivo mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

20 Ensayo de competición de factor B: Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con C3b humana (1,0 µg/50 µl por pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la proteína, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento sirvieron como control de fondo. Se añadieron partes alícuotas del factor B en concentración variable de C3b en tampón AP que contiene factor B 100 nM y las placas se dejaron incubar durante 2 horas. Factor B unido a C3b se midió mediante la adición de detección de anticuerpo policlonal de factor B anti-humano de cabra) a una dilución 1:2000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-cabra de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1: 2000 en disolución de bloqueo) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB). Después de la incubación durante 30 minutos a 25°C, la reacción de TMB se inactivo mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

30 La inhibición de la unión de properdina a C3bB se realizó como se describe arriba, con la única diferencia de que la placa se incubó con 100 nM de factor B en tampón AP durante 1 hora antes de la incubación del anticuerpo y properdina. La razón de esto era generar el complejo C3bB en la placa antes de la adición de properdina a la placa.

35 Tal como se muestra en la Fig. 20, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la unión de properdina a C3b y la Fig. 21 muestra la inhibición de la unión de properdina a complejo C3bB con afinidades similares. Tal como mostraron los autores de la invención en ejemplos anteriores, la unión de factor B al complejo C3b de properdina es más alta que C3b sola. Como se muestra en la Fig. 22, factor B une preferentemente C3b unida a sustrato en comparación con C3b de fase soluble. Estos datos sugieren que el Factor B de unión a C3b daría lugar a que se favoreciera la activación de convertasa C3.

Ejemplo 11**Properdina Une C3b con alta afinidad, iC3b, C3c con afinidad Moderada y No Une C3 y C3dg**

40 C3 nativa existe en disolución a una concentración muy alta (1,3 mg/ml) en el plasma y es la proteína más abundante encontrada en el plasma. Como resultado de la inactivación al ralentí, una pequeña fracción de C3 se convierte en C3b. Properdina une C3b con alta afinidad. Factor B también une C3b con alta afinidad. Factor B no une C3b en fase de disolución. La unión de properdina a C3b es de alta afinidad (2 nM), una afinidad deficiente se observó con iC3b, C3c y no se observó unión alguna con C3dg. Basándose en la relación de 1: 1 con la inhibición de MoAb en el plasma, es fácil predecir que la totalidad de la unión de properdina es una unión productiva. Debido a la alta afinidad de properdina para C3b en comparación con iC3b y C3c, se concluye que la inhibición de la asociación de properdina a C3bB es crítica para la inhibición de AP.

50 Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con C3b, iC3b, C3c o C3d humana (1,0 µg/50 µl por pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4°C. Después de aspirar la proteína, los pocillos se bloquearon con PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Pocillos sin revestimiento sirvieron como control de fondo. Se añadieron partes alícuotas de suero humano en concentración variable de tampón AP y las placas se dejaron incubar durante 2 horas. Properdina unida a los fragmentos de C3b revestidos con sustrato se midió mediante la adición de anticuerpo de detección anticuerpo monoclonal de properdina anti-humano a una dilución 1:1000 en disolución de bloqueo. La placa se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón de

cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1: 1000 en disolución de bloqueo) (Sigma Chemical Company) y se dejó incubar durante 1 hora. La placa se volvió a enjuagar a fondo con PBS, y se añadieron 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Después de la incubación durante 30 minutos a 25°C, la reacción de TMB se inactiva mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

- 5 La Fig. 18 demuestra que la properdina se une a C3b es la afinidad más alta en comparación con la deficiente afinidad a otros fragmentos de C3b. Estos datos se generaron utilizando suero humano y no properdina libre. Parece que hay o no hay uniones de properdina a C3dg. Dado que properdina une C3b con alta afinidad y el complejo impulsa a que se produzca la unión productiva de factor B. Independientemente de interacciones de unión, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ une y neutraliza la función properdina.

10 Ejemplo 12

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Actividad de Factor D como se Muestra por la Inhibición de la Producción de Convertasa C3 por AP

- 15 La etapa más importante en la activación de AP es la escisión de Factor B por parte del factor D. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ impide la escisión de factor B mediada por el Factor D. Los autores de la invención han demostrado que la activación de AP no se produce en suero agotado en properdina. Por lo tanto, la properdina desempeña un papel importante en la escisión de factor B mediada por el Factor D. En ausencia de properdina, el factor D no corta el factor B para formar C3 convertasa. Experimentos de unión directa demuestran que la unión de properdina a factor D es dependiente de la dosis (datos no mostrados). Es probable que el factor P funcione como un cofactor para D. Los autores de la invención han creado un experimento en el que el suero humano normal en tampón AP es activado por LPS. Como resultado, se activa AP. La activación de AP prosigue a través de la formación de convertasa C3 de AP. Evaluaron si el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe convertasa C3 de AP. La convertasa C3 total se detectó con anticuerpos contra properdina, C3b y Bb. Si los tres se encuentran depositados, significa que se ha producido la activación de AP.

- 25 En un ensayo típico, pocillos de placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con LPS (siglas inglesas de lipopolisacárido de Salmonella typhosa) 2 µg/ 50 µl en PBS durante la noche. Los pocillos se incubaron con BSA al 1% en PBS para bloquear los sitios no ocupados en la placa. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, la placa se lavó una vez con PBS. Suero humano normal (al 13.5%) en tampón AP se mezcló con concentraciones variables del anticuerpo y se incubó con pocillos recubiertos con LPS. La placa se incubó durante 2 horas a 37°C para permitir que se produjera la activación de AP del complemento. Después de la incubación, las placas fueron extensamente con PBS, y los componentes de la convertasa C3 se detectaron apropiadamente con anticuerpos. Los autores de la invención detectaron C3b con C3c anti-humana de conejo a razón de 1:2000 en disolución de bloqueo, P anti-humana de cabra a razón de 1:2000 en disolución de bloqueo y conjugado Bb anti-humano de ratón marcado con peroxidasa en disolución de bloqueo. Las placas se incubaron con sus respectivos anticuerpos durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron con PBS y se detectaron con anti-conejo de cabra marcado con peroxidasa a razón de 1:2000 para C3b y anti-cabra de conejo marcado con peroxidasa a razón de 1:2000 en disolución de bloqueo para la detección de P. Todas las placas se desarrollaron con TMB después de un lavado extensivo con PBS. El color azul se inactivó con ácido ortofosfórico 1 M. Las tres C3b, Bb y P juntas son indicativas de la formación de convertasa C3 de AP.

En un experimento separado, C5b-9 se detectó con conjugado neo sC5b-9 anti-ratón de cabra. Estos datos son indicativos de la formación de C5b-9.

- 40 La Fig. 23 demuestra una inhibición dependiente de la dosis de la formación de C3b, observándose la inhibición más alta a la concentración más alta del MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. La Fig. 24 demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la deposición de properdina. Estos datos sugieren que la falta de formación de C3b significa que no hay deposición de properdina. La Fig. 25 demuestra que Bb no se deposita de una manera dependiente de la dosis y que la concentración más alta de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ provoca la inhibición máxima de la deposición de Bb. Estos datos proporcionan una evidencia directa de que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ detuvo la producción de convertasa C3. La Fig. 26 muestra que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C5b-9 mediante la inhibición de la formación de convertasa C3. Estos datos indirectamente apoyan la idea de que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la actividad del factor D en el factor B.

Ejemplo 13

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación del Complemento en el Modelo de Sangre Entera de Baipás Cardiopulmonar

- 50 El modelo de bucle de tubo es un modelo representativo para demostrar la activación mediada por la vía alternativa del complemento. El actual modelo evaluaría la activación de AP en situaciones en donde la sangre entra en contacto con las superficies artificiales. Este modelo imita estrechamente la activación del complemento que se observa durante la circulación extracorpórea. El experimento de bucle de tubo se realizó recogiendo sangre fresca

de un donante sano utilizando las directrices aprobadas por la IRB. La sangre se recogió en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL que contenían 5 unidades/ml de heparina (mucosa porcina) como anticoagulante. La sangre se añadió a los tubos precargados con plasmalyte 148 que contiene diversas concentraciones de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. 1,8 ml de esta sangre diluida que contiene las concentraciones apropiadas de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ se añadieron a tubos de poli(cloruro de vinilo) (PVC) (PE 330; D.I., 2,92 mm; D.O, 3,73 mm; Clay Adams, NJ). Los tubos se cerraron en un bucle y se sometieron a una rotación vertical durante al menos 2-3 horas a 37°C. Después de la incubación, las muestras de sangre se transfirieron a tubos de 2,0 ml. Se adquirieron partes alícuotas de sangre para la citometría de flujo. Las muestras de sangre remanentes se centrifugaron (4000 veces.g durante 5 minutos a 4°C.) y el plasma se recogió. Se evaluaron las muestras de plasma en cuanto a la actividad del complemento utilizando kits de C3a y C5b-9 (Quidel), kits de C5a (BD-Pharmingen), y el ensayo de lisis de eritrocitos de conejo. La lisis de eritrocitos de conejo se realizó como se describe en los Ejemplos anteriores, con la única diferencia importante de que muestras de plasma del bucle de tubo se diluyeron en la relación 1:1 y después se añadieron a los eritrocitos de conejo.

Como resultado de la activación de AP, se forma convertasa C3 que escinde C3 en C3a y C3b. C3a es una anafilatoxina potente que activa neutrófilos, monocitos y linfocitos. Durante el proceso de bucle de tubo, la vía alternativa se activa y da como resultado la formación de la convertasa C3 que provoca la formación de C3a. La Fig. 27 demuestra que la inhibición de la vía alternativa resulta en una inhibición dependiente de la dosis de la formación de C3a con una inhibición completa observada a aproximadamente 10 ug/ml.

C5a es otra anafilatoxina potente que es la responsable de activar muchas células inflamatorias. C5a se produce por escisión mediante convertasa C3 de C5 en C5a y C5b. Como se ha demostrado por la Fig. 28, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe de forma dependiente de la dosis la generación de C5a con una inhibición completa en aproximadamente 10 ug/ml. Este número se corresponde con los resultados de C3a con la inhibición completa en aproximadamente 10 ug/ml, lo que indica que el MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ es capaz de inhibir eficazmente la función de convertasa C3.

C5b-9 es componente terminal de la cascada del complemento y funciona como un complejo de formación de poros lítico que se deposita sobre membranas y causa su lisis. El ensayo de hemólisis hace uso de este concepto y la formación de depósitos de C5b-9 sobre estas células y causa su lisis. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la actividad de la vía alternativa y, por lo tanto, previene la formación de C5b-9 tal como se demuestra por la Fig. 29. En esta figura, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ es capaz de inhibir de forma dependiente de la dosis la formación de C5b-9 con una inhibición completa observada a ~ 5 a 10 ug/ml. Estos números se corresponden con los valores obtenidos de los resultados de C3a y C5a.

30 Ejemplo 14

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación Celular en el Modelo de Sangre Entera de Baipás Cardiopulmonar

Los autores de la invención han demostrado que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe los mediadores inflamatorios C3a y C5a. Estas moléculas son potentes activadores de neutrófilos, monocitos y plaquetas. Se sabe que receptores para C3a y C5a están presentes en cada uno de estos tipos de células. En un modelo de bucle de tubo de baipás cardiopulmonar los autores de la invención evaluaron la capacidad de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ de inhibir la activación celular. Utilizando el método de bucle de tubo como se describe en el Ejemplo anterior, evaluaron el efecto de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a diversas concentraciones (0,5-100 ug/ml) sobre el efecto de la activación celular. Después del proceso de bucle de tubo, se recogió una parte alícuota de sangre de los bucles de tubo para el análisis de citometría de flujo.

Partes alícuotas de sangre fueron teñidas con FITC-CD14 y PE-CD11b para monocitos, FITC-CD15 y PE-CD11b para neutrófilos y FITC-CD61 y PE-CD62P para plaquetas. Se marcaron sólo 50 µl de muestras de sangre. Tras una incubación durante 20 min a temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de disolución de lisis FACS y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Las muestras se centrifugaron durante 5 min para sedimentar las células. El sobrenadante se retiró y las células se re-suspendieron en tampón de lavado (BSA al 0,1% en PBS/azida). Las muestras se centrifugaron de nuevo, se separó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,5 ml de paraformaldehído al 0,5%.

Los neutrófilos son células inflamatorias potentes, capaces de liberar varios componentes nocivos que median en la respuesta inflamatoria. Tal como se describió anteriormente, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la formación de C3a y C5a durante el bucle de tubo. Estas anafilatoxinas son las responsables de la activación de neutrófilos, monocitos y plaquetas. El tratamiento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la activación de neutrófilos tal como se mide a través de la expresión de CD11b con una inhibición completa observada a aproximadamente 10-20 µg/ml (Fig. 30). Esto se corresponde muy estrechamente con los resultados obtenidos para la inhibición de la formación de C3a y C5a.

Los monocitos son otra célula inflamatoria importante que es la responsable de la mediación en la respuesta inflamatoria. Son especialmente conocidos por la producción de TNF-alfa, una de las citoquinas inflamatorias más

potentes. Los monocitos se activan a través de la unión de C3a y C5a a sus respectivos receptores. Los monocitos fueron evaluados con citometría de flujo como se describe anteriormente en este Ejemplo. El tratamiento con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ demuestra una inhibición dependiente de la dosis de la activación de monocitos tal como se mide a través de la expresión de CD11b con una inhibición completa observada en aproximadamente 10 µg/ml (Fig. 31). Esto se corresponde muy estrechamente con los resultados obtenidos para la inhibición de la formación de C3a y C5a, así como los resultados de la inhibición de neutrófilos.

Las plaquetas se activan a través de mecanismos similares a la activación de monocitos y neutrófilos. Sin embargo, las plaquetas no son responsables de las respuestas inflamatorias, sino que son más importantes en la regulación de la hemostasis. En la circulación extracorpórea, una disfunción plaquetaria conduce a complicaciones hemorrágicas graves y complejas. La prevención de la disfunción plaquetaria es un aspecto crítico del desarrollo de productos terapéuticos para el baipás cardiopulmonar. Las plaquetas se evaluaron utilizando la citometría de flujo descrita anteriormente utilizando muestras de bucle de tubo. La Fig. 32 demuestra que la inhibición dependiente de la dosis de la activación plaquetaria medida a través del marcador de la activación plaquetaria CD62P. La inhibición completa se observó a aproximadamente 10 µg/ml. Estos números son consistentes con todos los otros experimentos.

Ejemplo 15

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe los Agregados de Plaquetas-Leucocitos en el Modelo de Sangre Entera de Baipás Cardiopulmonar

Se han encontrado agregados asociados con varias enfermedades. Las plaquetas activadas pueden formar agregados de neutrófilos-plaquetas y monocitos-plaquetas. Tales agregados han sido implicados en enfermedades relacionadas con el corazón. Más específicamente, conjugados de monocitos-plaquetas han demostrado indicar una posibilidad de ataque al corazón. Utilizando enfoques de citometría de flujo, los autores de la invención han sido capaces de medir la presencia de conjugados de plaquetas-leucocitos en sangre que han sido objeto de circulación extracorpórea. Este método funciona mediante la evaluación de la presencia de plaquetas en las poblaciones de neutrófilos-monocitos.

Agregados de neutrófilos-plaquetas fueron marcados con CD61 marcada con FITC (marcador del cuerpo de plaquetas), y CD15 marcada con PE (marcador de cuerpo de neutrófilos): una parte alícuota de 50 µl de sangre del bucle de tubo (tanto control como tratada) se incubó inmediatamente con 20 µl de anticuerpo FITC-CD61 y 20 µl de anticuerpo PE-15 CD. Después de 20 min de incubación, se añaden 2 ml de disolución de lisis de FACS y la muestra tratada se incuba a continuación a TA durante 20 min. La lisis de FACS provoca la lisis de glóbulos rojos y al mismo tiempo fija los leucocitos marcados. Muestras se centrifugaron a 300 g durante 5 min. Se separa el sobrenadante y las células se re-suspenden en tampón de lavado (BSA al 0,1% en PBS/azida). Las muestras se centrifugaron de nuevo, se separa el sobrenadante, y las células se resuspenden en 0,5 ml de para-formaldehído al 0,5% durante la noche antes de su análisis utilizando un citómetro de flujo BD-LSR. Los conjugados se detectaron midiendo la tinción dual de CD61 y CD15 en la zona de neutrófilos. El desplazamiento en el marcaje con FITC indica si más plaquetas han migrado a la región de los neutrófilos. Agregados de monocitos-plaquetas (CD61 marcado con FITC, y CD14 marcado con PE): Para el marcaje de los monocitos, el proceso de tinción y el procesamiento de la muestra es el mismo que el desarrollado para los neutrófilos, excepto que el marcador de identificación celular es el marcador de monocitos selectivo, CD61 marcado con FITC. Los métodos para el marcador CD14 son los mismos. El método para la evaluación de los conjugados es el mismo que el descrito anteriormente.

La Fig. 33 demuestra la inhibición de la formación de agregados con el tratamiento de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ (0,5-100 ug/ml). MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe completamente la formación de agregados a ~10 ug/ml, que es coherente con los resultados anteriores.

Ejemplo 16

Inhibición de la Formación de TNF-alfa por MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ después de la circulación extracorpórea

TNF-alfa es una potente citoquina inflamatoria que ha sido implicado en varias patologías de enfermedades. TNF-alfa es una citoquina pro-inflamatoria que recluta a otros mediadores inflamatorios para exacerbar la respuesta inflamatoria. La inhibición de TNF-alfa es un marcador clave para la inhibición de las respuestas inflamatorias. Utilizando los métodos de bucle de tubo descritos en los Ejemplos anteriores, muestras de sangre tratadas con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ se centrifugaron para el plasma y se evaluaron con un TNF ELISA (BD-Biosciences).

En resumen, placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con 50 µl de un anticuerpo de captura diluido en la relación 1:100 durante la noche a 4°C. Los pocillos se aspiraron y se bloquearon con disolución de BSA al 1%/PBS durante 1 hora. Los pocillos se aspiraron y se incubaron con 100 µl de plasma de bucle de tubo. El plasma

se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se aspiraron y se lavaron con PBS 5 veces. 100 µl de anticuerpo de detección marcado con biotina diluido en la relación 1:200 en BSA al 1%/PBS se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron y se incubaron con 100 µl de conjugado de estreptavidina-HRPO durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron y se lavaron con PBS 5 veces y se desarrollaron con TMB. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1M y la placa se leyó a 450 nm con un lector de microplacas.

Tal como se demuestra por la Figura 8, el tratamiento de muestras de bucle de tubo con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ (0,5-100 ug/ml) demuestra la inhibición dependiente de la dosis con una inhibición completa observada a aproximadamente 10 ug/ml. Este número coincide con los resultados de los otros ensayos, así como la dosis para la inhibición completa de monocitos vista en la Fig. 34.

Ejemplo 17

Reducción de los niveles de properdina libre por MoAb⁷¹⁻¹¹⁰

Anticuerpo monoclonal anti-properdina de la presente invención es capaz de reducir los niveles de properdina libre en el plasma tratado con el anticuerpo monoclonal de la invención. Siguiendo el modelo de bucle de tubo, se evaluaron muestras de plasma en cuanto a la presencia de properdina libre. Los controles rotados muestran altos niveles de properdina. La cantidad de properdina libre en disolución se reduce tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal de la invención.

Placas de ELISA se recubrieron con un anticuerpo policlonal purificado a una relación de dilución de 2 µg/50 µl/pocillo. Después de una incubación durante la noche a 4°C, la placa se trató con disolución de bloqueo (BSA al 1% en PBS). Después de retirar la disolución de bloqueo, la placa se incubó con las muestras de plasma del modelo de bucle de tubo. Y las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una subida a fondo con PBS, los pocillos se incubaron con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ marcado con biotina (dilución 1:1000 en disolución de bloqueo). El anticuerpo marcado unido se detectó con peroxidasa conjugada con neutravidina (Pierce) durante 1 hora. El color se desarrolló con sustrato de TMB.

Tal como se muestra en la Fig. 35, el anticuerpo monoclonal de la invención reduce los niveles de properdina libre.

Ejemplo 18

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Liberación de Neutrófilo Elastasa Durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera.

El neutrófilo elastasa es un potente mediador de la respuesta inflamatoria que se libera cuando se activan los neutrófilos, ya sea a través de mecanismos mediados por el complemento o de mecanismos no mediados por el complemento. Independientemente del mecanismo de activación, el neutrófilo elastasa se libera y resulta en muchos efectos perjudiciales.

Se demuestra que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ puede regular a la baja la liberación de neutrófilo elastasa mediante la inhibición de la activación del complemento mediada por neutrófilos. Los autores de la invención utilizaron el modelo de bucle de tubo según se describió anteriormente para provocar la activación del complemento en la sangre y demostrar la inhibición por el anticuerpo. Con el fin de demostrar la inhibición del neutrófilo elastasa, una placa de microtitulación de poliestireno (Corning) se revistió con 50 µl de una dilución 1:500 de anticuerpo de captura del neutrófilo elastasa (el Sitio de Unión) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los pocillos se aspiraron y se bloquearon con disolución de BSA al 1%/PBS durante 2 horas. Después del bloqueo, los pocillos se incubaron con 100 µl de muestras de plasma de bucle de tubo diluidas en la relación 1:25 en tampón AP. Después de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y se lavaron cinco veces con 200 µl de PBS. Los pocillos se incubaron a continuación con 100 µl de anticuerpo conjugado con peroxidasa alfa-1 tripsina anti-humano de oveja (el Sitio de Unión) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron y se lavaron cinco veces con 200 µl de PBS. La placa se desarrolló y se analizó utilizando métodos ELISA estándares descritos anteriormente.

La Fig. 36 demuestra la inhibición de la liberación de Neutrófilo Elastasa en diversas concentraciones del anticuerpo. La inhibición se observa a bajas concentraciones del anticuerpo.

Ejemplo 19

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Liberación de TNF-alfa Durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera

TNF-alfa es una citoquina inflamatoria clave implicada en la inflamación. Es una potente citoquina que es la responsable de generar varios componentes inflamatorios aguas abajo que exacerbaban la respuesta inflamatoria.

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ regula eficazmente a la baja la generación y liberación de TNF-alfa que es la resultante de la activación del complemento. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la vía alternativa aguas arriba e inhibe la activación mediada por anafilotoxinas de monocitos, las células principalmente responsables de la generación de TNF-alfa. Los autores de la invención utilizaron muestras de bucle de tubo que han sido sometidas a la activación del complemento para demostrar que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ inhibe la producción de TNF-alfa. Placas de microtitulación de poliestireno se recubrieron con 100 µl de anticuerpo de captura TNF (BD Biosciences) a una dilución 1:100 en PBS. La placa se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente los pocillos se aspiraron y se bloquearon durante 2 horas con disolución de BSA al 1%/PBS. Después del bloqueo, los pocillos se incubaron con muestras de plasma de bucle de tubo sin diluir. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y se lavaron 5 veces con 200 µl de PBS. El TNF-alfa capturado se detectó utilizando un anticuerpo de detección de TNF-alfa biotinilado (BD Biosciences) a una dilución 1:1000 en BSA al 1%/PBS. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se procesó siguiendo métodos de ELISA estándares descritos anteriormente.

La Fig. 37 demuestra una inhibición significativa de TNF-alfa por parte de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en comparación con controles no tratados. Esta inhibición se observa a todas las concentraciones testadas. La Figura 35 también demuestra la inhibición de la producción de TNF alfa por parte de monocitos en el modelo de circulación extracorpórea.

Ejemplo 20

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ e IgG, F(ab)2 y F(ab) inhiben la Formación de C5b-9 en el Ensayo de Hemólisis de Eritrocitos tras la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera

El efecto de IgG, F(ab)2 y Fab se evaluó en un ensayo de hemólisis dependiente de la vía alternativa utilizando eritrocitos de conejo y suero humano normal. La superficie de los eritrocitos activa la vía alternativa del complemento en suero humano normal. Como resultado, C5b-9 se forma en la superficie de los eritrocitos, provocando la lisis celular. El ensayo mide la inhibición de la lisis de eritrocitos como una función del tiempo.

Métodos para el ensayo de lisis se describen en los Ejemplos anteriores. En este experimento la concentración final del anticuerpo monoclonal sería de 40 µg/ml. Los autores de la invención compararon IgG, F(ab)2 y Fab para determinar la capacidad inhibitoria del anticuerpo intacto y sus fragmentos.

Se encontró que los tres son igualmente potentes en la inhibición de la hemólisis dependiente de la vía alternativa.

Ejemplo 21

Valoración Terapéutica de la Actividad del Complemento en Conejos a los que se administraron Diversas Dosis de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰

Conejos blancos de Nueva Zelanda fueron dosificados por vía intravenosa con MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a razón de 5,04 mg/kg, 1,41 mg/kg, 0,54 mg/kg y 0,05 mg/kg en solución salina. Tras la dosificación i.v., las muestras de sangre fueron extraídas a través de la arteria central de la oreja. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas para eliminar el coágulo. Los sueros se congelaron a -80°C hasta su uso. Suero de conejo recogido en diversos instantes en el transcurso de 105 horas se sometieron a una hemólisis típica de rRBC dependiente de AP utilizando métodos estándares. Se generaron operaciones cinéticas a cada concentración de suero de conejo. Las lecturas cinéticas de punto final se representaron frente al tiempo para generar la Fig. 38. Correspondientemente, las muestras también se evaluaron en un ensayo de C3b-properdina para determinar el efecto de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la prevención de la asociación de properdina con C3b como se muestra en la Fig. 39. Los resultados en la Fig. 39 son paralelos a los resultados mostrados en la Fig. 38.

Los resultados de las Figs. 38 y 39 se utilizaron en la evaluación del efecto de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la duración de la actividad del complemento. La inhibición de la actividad del complemento en conejos es linealmente proporcional a la dosis de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. La Fig. 40 muestra el efecto terapéutico de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en la actividad del complemento en conejos. La actividad del complemento es inhibida a una velocidad de 0,05 mg/kg por hora. Tal como se muestra, una dosis de 1 mg/kg es efectiva durante un período de 20 horas. Por lo tanto, la eficacia terapéutica se determina basándose en la dosis y, por lo tanto, se puede controlar fácilmente para un uso dado. La dosis de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ puede ser fácilmente predicha en base al gráfico mostrado en la Fig. 40.

La Fig. 39 muestra que los niveles de properdina vuelven a la normalidad después de haberse perdido el efecto del fármaco, en que el efecto del fármaco se mide en términos de inhibición de la actividad del complemento. Tal como se muestra en las Figs. 38 y 39, la pendiente del retorno de la actividad del complemento y properdina en cada una

de las dosis en conejos dan una pendiente muy similar. La tasa de síntesis de properdina parece ser consistente para cada una de las tres dosis más altas utilizadas. Se calculó la tasa de síntesis en base al porcentaje de síntesis por hora. Las Figs. 41 y 42 muestran que la tasa de la síntesis de properdina después de la disminución de la inhibición de la actividad del complemento es 6-7% por hora. En el espacio de 15 - 20 horas después de los efectos del fármaco, la concentración de properdina vuelve a la normalidad.

La Fig. 43 muestra la cinética del consumo de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ como una función del tiempo. MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en las tres concentraciones más altas muestra un decaimiento exponencial con el tiempo. Sólo permanece anticuerpo 100 nM al término de 100 horas en conejos a los que se administró una dosis de 5 mg/kg de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰. El nivel de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ a 100 nM (más/menos 20 nM) provoca la inhibición. Si la concentración de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ cae por debajo de ese nivel, no se inhibirá la actividad del complemento.

Ejemplo 22

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ No Inhibe la Formación de C4d dependiente de la Vía Clásica.

Este ensayo evalúa la capacidad de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ de inhibir la formación de C4d en un ajuste de vía clásica. C4d es un componente de la convertasa C3 de la vía clásica. Pocillos de microtitulación de poliestireno se recubrieron con 50 µl de ovoalbúmina al 1% en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Los pocillos se aspiraron y se bloquearon con 300 µl de BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron de nuevo y cada uno de los pocillos se incubó con 50 µl de anticuerpo anti-ovoalbúmina diluido en la relación 1:1000 en BSA al 1%/PBS. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aspiraron y se enjuagaron con PBS cinco veces. Diversas concentraciones de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ se alicuotaron en suero humano al 2% diluido en tampón de gelatina veronal (GVB con calcio y magnesio 5 mM cada uno). Las concentraciones séricas fueron optimizadas en ensayos previos. Una parte alícuota de 100 µl de la disolución se incubó en los pocillos respectivos y se incubó a 37°C durante 2 horas. Los pocillos se aspiraron y se lavaron cinco veces con PBS. 50 µl de anticuerpo anti-C4d conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000) se añadieron a cada uno de los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se aspiró y se enjuagó a fondo con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB). Después de la incubación durante 30 minutos a 25°C, la reacción de TMB se inactivó mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico, y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas.

La Fig. 44 ilustra un gráfico que muestra que MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la formación de C4d dependiente de la vía clásica. La vía clásica es mediada a través de la presencia del complejo antígeno-anticuerpo. La presencia de los complejos provoca el reclutamiento de C1 y C1q, lo que provoca la escisión de C4 en C4a y C4b, que luego se une a C2a para formar el complejo C4b2a. Esta es la convertasa de la vía clásica activa, que luego prosigue para escindir C3 para conducir en última instancia a la formación de C5b-9. Tal como se muestra, MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ no inhibe la formación de C4d a las concentraciones utilizadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bansal, Rekha

<120> Anticuerpos Anti-Properdina

<130> NMT-018192WO ORD

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 469

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 538 114 T3

<400> 1

Met Ile Thr Glu Gly Ala Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu Pro Pro Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser Asp Pro Val Leu Cys
 20 25 30

Phe Thr Gln Tyr Glu Glu Ser Ser Gly Lys Cys Lys Gly Leu Leu Gly
 35 40 45

Gly Gly Val Ser Val Glu Asp Cys Cys Leu Asn Thr Ala Phe Ala Tyr
 50 55 60

Gln Lys Arg Ser Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp
 65 70 75 80

Ser Leu Trp Ser Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly
 85 90 95

Ser Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln Cys Ser
 100 105 110

Gly Lys Val Ala Pro Gly Thr Leu Glu Trp Gln Leu Gln Ala Cys Glu
 115 120 125

Asp Gln Gln Cys Cys Pro Glu Met Gly Gly Trp Ser Gly Trp Gly Pro
 130 135 140

Trp Glu Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Lys Gly Thr Arg Thr Arg Arg
 145 150 155 160

Arg Ala Cys Asn His Pro Ala Pro Lys Cys Gly Gly His Cys Pro Gly
 165 170 175

ES 2 538 114 T3

Gln Ala Gln Glu Ser Glu Ala Cys Asp Thr Gln Gln Val Cys Pro Thr
 180 185 190

His Gly Ala Trp Ala Thr Trp Gly Pro Trp Thr Pro Cys Ser Ala Ser
 195 200 205

Cys His Gly Gly Pro His Glu Pro Lys Glu Thr Arg Ser Arg Lys Cys
 210 215 220

Ser Ala Pro Glu Pro Ser Gln Lys Pro Pro Gly Lys Pro Cys Pro Gly
 225 230 235 240

Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys Pro Val
 245 250 255

Ala Gly Gly Trp Gly Pro Trp Gly Pro Val Ser Pro Cys Pro Val Thr
 260 265 270

Cys Gly Leu Gly Gln Thr Met Glu Gln Arg Thr Cys Asn His Pro Val
 275 280 285

Pro Gln His Gly Gly Pro Phe Cys Ala Gly Asp Ala Thr Arg Thr His
 290 295 300

Ile Cys Asn Thr Ala Val Pro Cys Pro Val Asp Gly Glu Trp Asp Ser
 305 310 315 320

Trp Gly Glu Trp Ser Pro Cys Ile Arg Arg Asn Met Lys Ser Ile Ser
 325 330 335

Cys Gln Glu Ile Pro Gly Gln Gln Ser Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly
 340 345 350

Arg Lys Phe Asp Gly His Arg Cys Ala Gly Gln Gln Gln Asp Ile Arg
 355 360 365

His Cys Tyr Ser Ile Gln His Cys Pro Leu Lys Gly Ser Trp Ser Glu
 370 375 380

Trp Ser Thr Trp Gly Leu Cys Met Pro Pro Cys Gly Pro Asn Pro Thr
 385 390 395 400

Arg Ala Arg Gln Arg Leu Cys Thr Pro Leu Leu Pro Lys Tyr Pro Pro
 405 410 415

ES 2 538 114 T3

Thr Val Ser Met Val Glu Gly Gln Gly Glu Lys Asn Val Thr Phe Trp
420 425 430

Gly Arg Pro Leu Pro Arg Cys Glu Glu Leu Gln Gly Gln Lys Leu Val
435 440 445

Val Glu Glu Lys Arg Pro Cys Leu His Val Pro Ala Cys Lys Asp Pro
450 455 460

Glu Glu Glu Glu Leu
465

<210> 2

< 211> 40

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp Ser Leu Trp Ser Thr Trp
1 5 10 15

Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly Ser Gln Leu Arg Tyr Arg
20 25 30

Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln
35 40

<210> 3

10 < 211> 114

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 538 114 T3

Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser Asp Pro Val Leu Cys Phe Thr Gln Tyr
 1 5 10 15

Glu Glu Ser Ser Gly Lys Cys Lys Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser
 20 25 30

Val Glu Asp Cys Cys Leu Asn Thr Ala Phe Ala Tyr Gln Lys Arg Ser
 35 40 45

Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp Ser Leu Trp Ser
 50 55 60

Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly Ser Gln Leu Arg
 65 70 75 80

Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln Cys Ser Gly Lys Val Ala
 85 90 95

Pro Gly Thr Leu Glu Trp Gln Leu Gln Ala Cys Glu Asp Gln Gln Cys
 100 105 110

Cys Pro

5 <210> 4

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 4

10 Cys Arg Ser Pro Arg Trp Ser Leu Trp Ser
 1 5 10

<210> 5

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

15 <400> 5

Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly
 1 5 10

<210> 6

< 211> 10

212> PRT

ES 2 538 114 T3

< 213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 7

5 < 211> 151

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de aminoácidos Vh de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰

10 <400> 7

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

<210> 8

15 < 211> 156

< 212> PRT

ES 2 538 114 T3

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de aminoácidos de VL de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰

<400> 8

Lys Glu Ile His Gln Ala Gly Lys Gly Ile Lys Met Lys Ser Gln Thr
1 5 10 15

Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser Gly Ala His Gly Ser
20 25 30

Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp
35 40 45

5 Arg Ile Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asp Val
50 55 60

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
85 90 95

Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Thr Thr Val Lys Ala Glu
100 105 110

Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
115 120 125

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
130 135 140

Thr Val Ser Ala Cys Thr Lys Gly Glu Phe Ala Ala
145 150 155

<210> 9

< 211> 16

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> CDR1 de Vh

<400> 9

15 Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Pro Ile His Trp Val
1 5 10 15

<210> 10

ES 2 538 114 T3

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> CDR2 de Vh

<400> 10

Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro
1 5 10 15

Asp Glu Arg Phe Arg Asp Arg Ala Thr
20 25

<210> 11

< 211> 16

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> CDR3 de Vh

<400> 11

15 Cys Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Asp
1 5 10 15

<210> 12

< 211> 15

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20 <220>

< 223> CDR1 de VI

<400> 12

Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln
1 5 10 15

25 <210> 13

< 211> 9

< 212> PRT

ES 2 538 114 T3

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> CDR2 de VL

<400> 13

5

Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 14

< 211> 14

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> CDR3 de VL

<400> 14

Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-properdina o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a SEQ ID NO: 2 y bloquea la activación alternativa de la vía de alternativa sin afectar a la activación de la vía clásica en un mamífero, para uso en un método para mejorar una enfermedad o afección asociada con una activación excesiva o incontrolada del complemento de la vía alternativa en el mamífero.
- 5
2. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SEQ ID NO: 2 para inhibir la activación del complemento de la vía alternativa en una relación molar de anticuerpo a Factor P de aproximadamente 1:1.
- 10
3. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es para la administración in vivo o ex vivo.
4. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es monoclonal.
- 15
5. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado, desimmunizado o humano.
6. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019.
- 20
7. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo que un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019.
8. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las regiones variables murinas de un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma depositada bajo el número de acceso ATCC PTA-9019 y regiones constantes humanas.
- 25
9. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo:
 un dominio variable de la cadena pesada que incluye las secuencias de aminoácidos de las tres CDRs en SEQ ID NO:7, y
 un dominio variable de la cadena ligera que incluye las secuencias de aminoácidos de las tres CDRs en SEQ ID NO: 8, en donde el anticuerpo se une a properdina humana.
- 30
10. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, exhibiendo el anticuerpo al menos una de las propiedades funcionales: el anticuerpo inhibe la unión de properdina a C3b, el anticuerpo reduce la formación de C3bB, el anticuerpo reduce la formación de convertasa C3, el anticuerpo reduce la producción de C3a y C5a, el anticuerpo reduce la formación del complejo C5b-9, el anticuerpo reduce la activación de neutrófilos, el anticuerpo reduce la activación de monocitos, el anticuerpo reduce la activación de plaquetas o el anticuerpo reduce la formación de conjugados de leucocitos-plaquetas.
- 35
11. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une específicamente a oligómeros de properdina y fomenta la disociación de los oligómeros de properdina a monómeros de properdina.
- 40
12. El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde regiones variables de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente, y en donde las regiones variables de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR2 del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente.
- 45
13. Un anticuerpo anti-properdina monoclonal o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a SEQ ID NO: 2 y bloquea la activación de la vía alternativa sin afectar a la activación de la vía clásica en un mamífero, para uso como un medicamento.

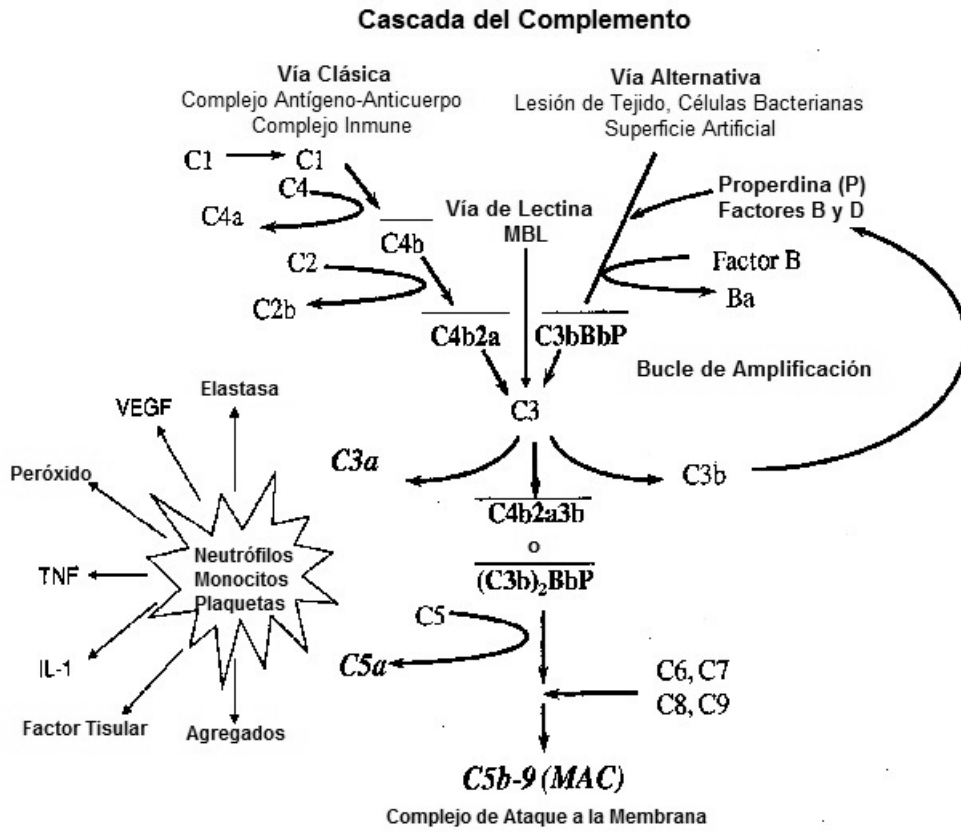


Fig. 1

Esquema de la Activación Alternativa del Complemento

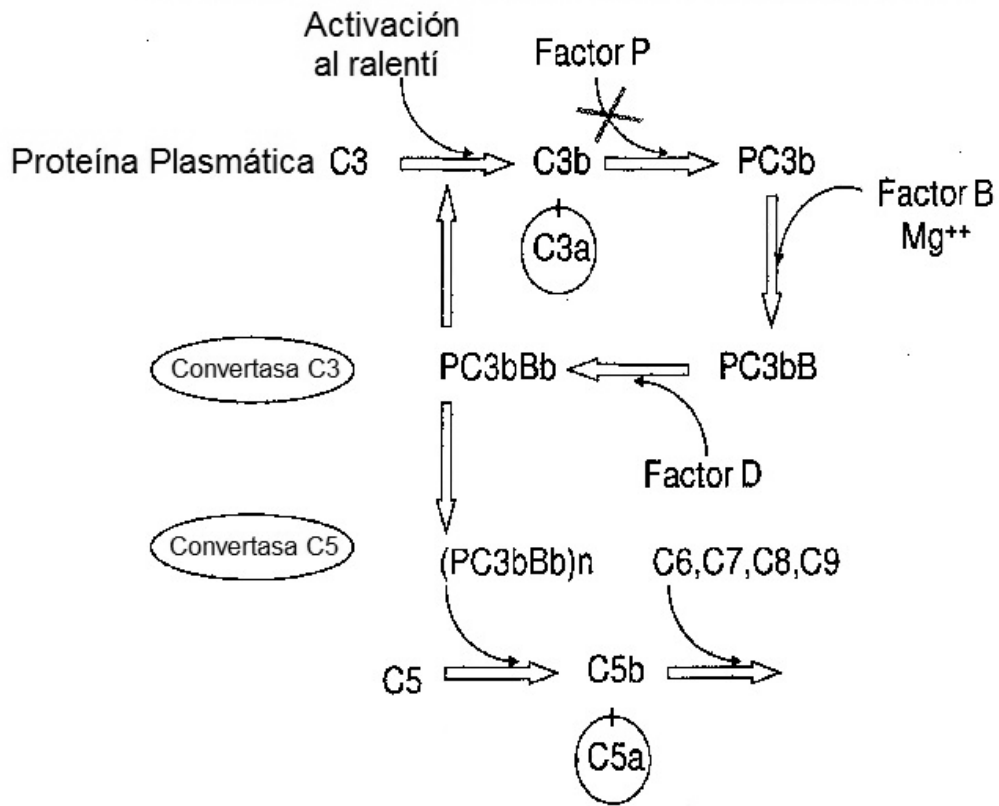


Fig. 2

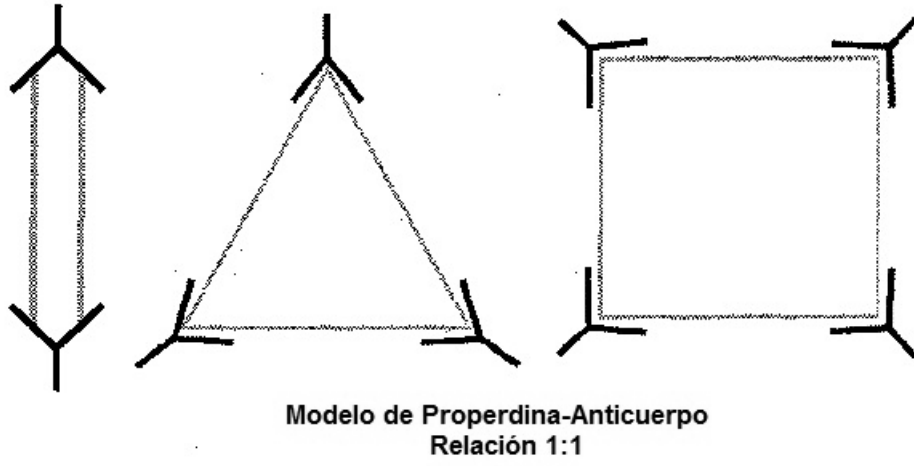


Fig. 3

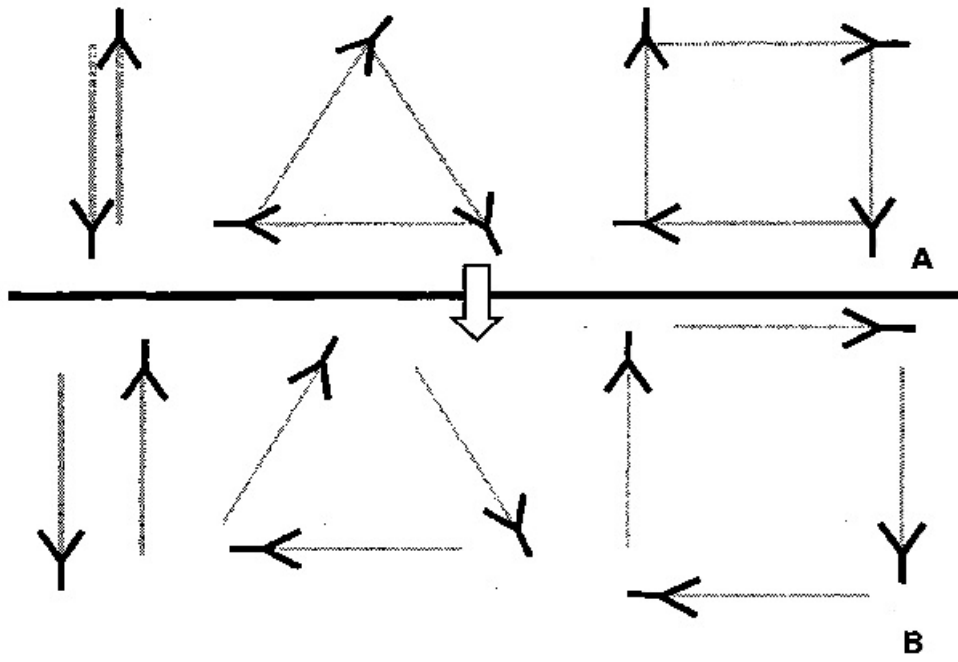


Fig. 4

Péptido CRSPRWSLWS de Properdina
Inhibe la Formación de C5b-9

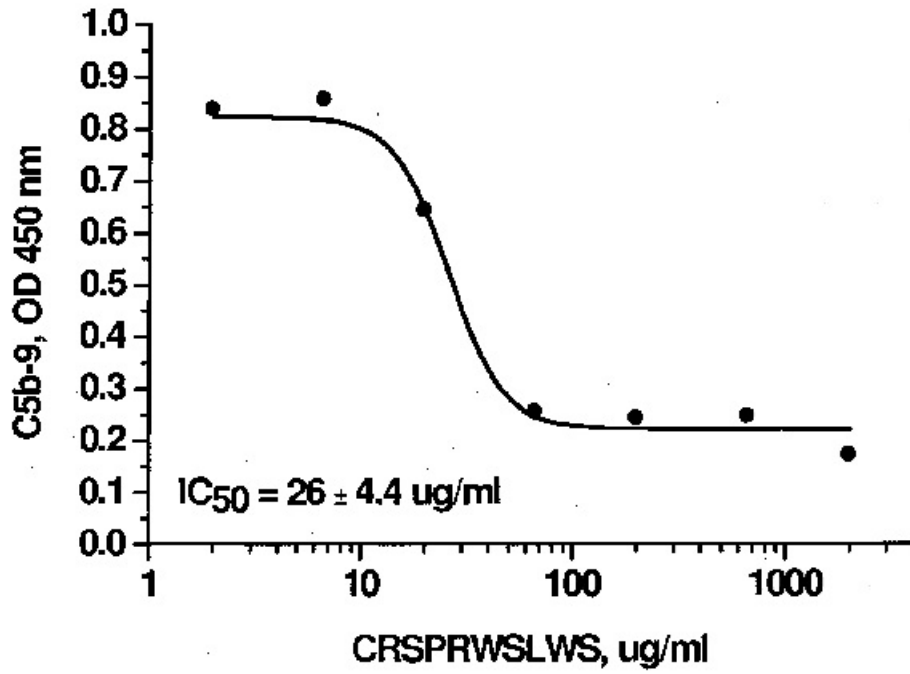


Fig. 5

**Péptido CRSPRWLSLWS de Properdina
Inhibe la Unión de Properdina a C3b**

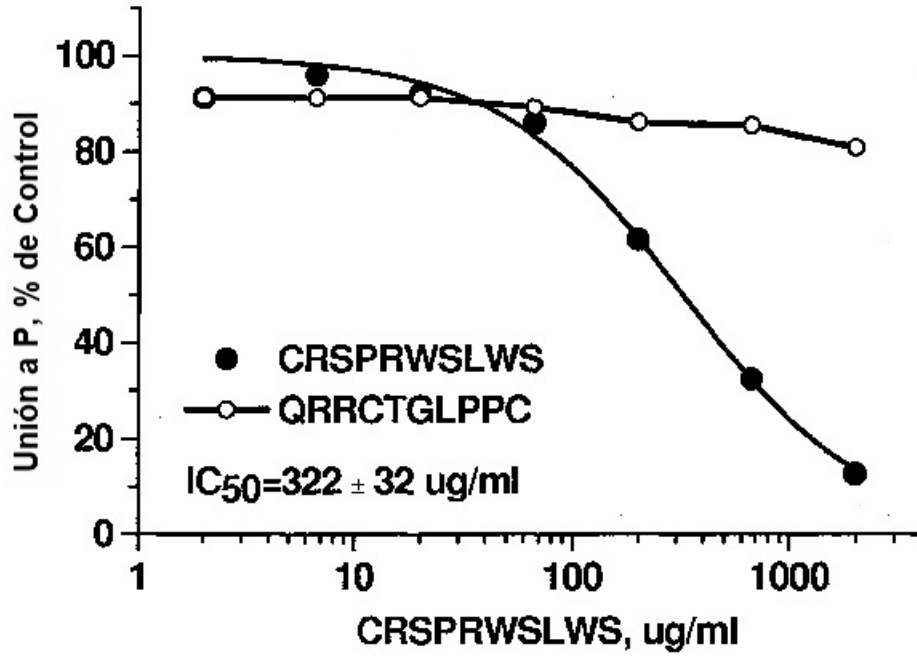


Fig. 6

**Péptido RYRRCVGWNG de Properdina
Inhibe la Formación de C5b-9**

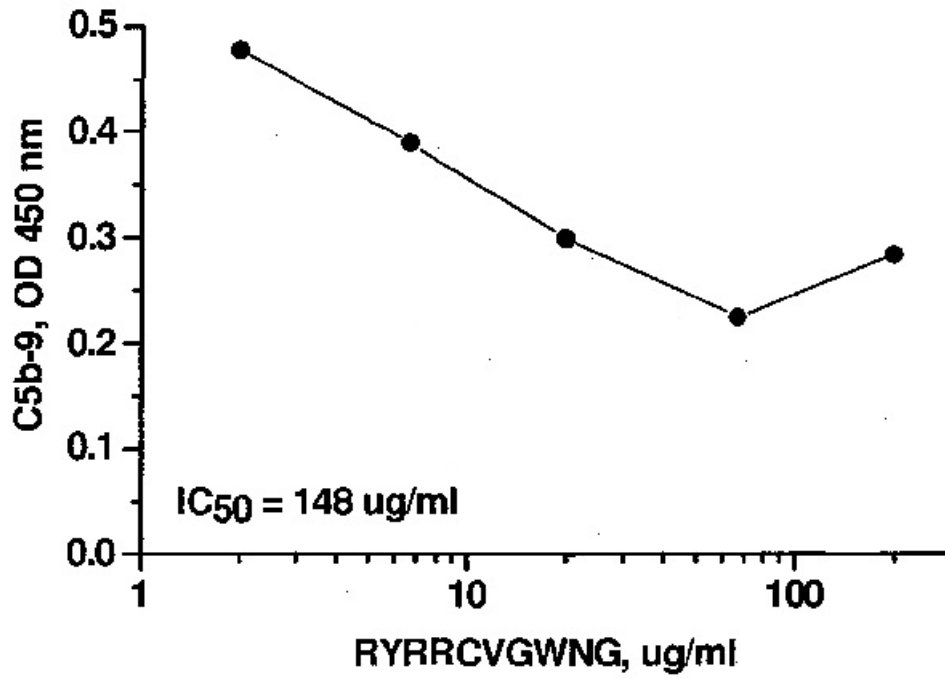


Fig. 7

**Péptido RYRRCVGNWNG de Properdina
Inhibe la Unión de Properdina a C3b**

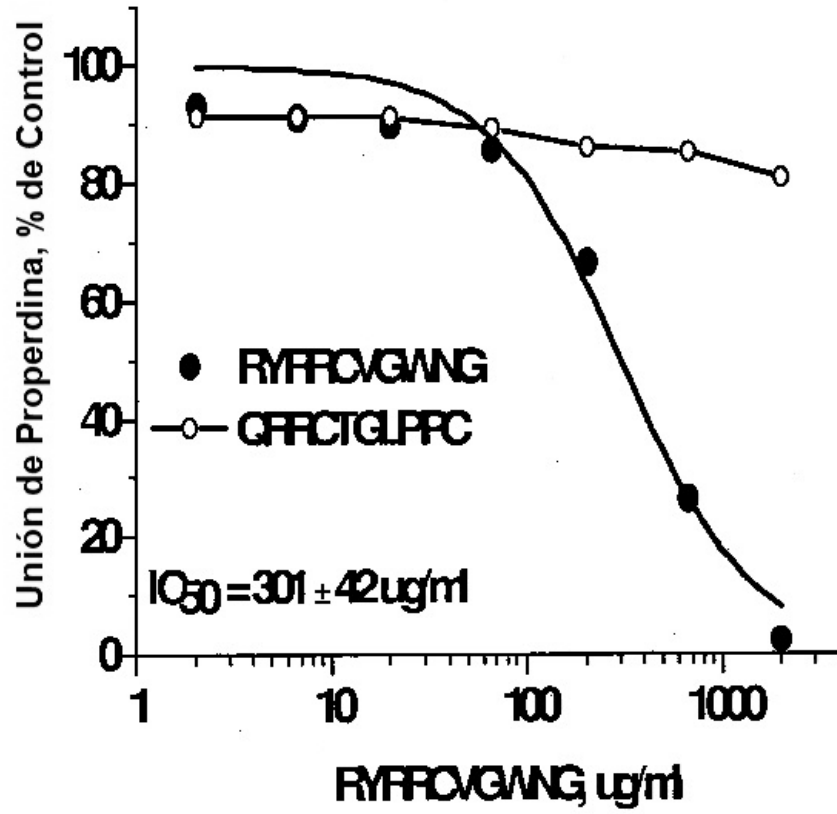


Fig. 8

Péptido⁷¹⁻¹¹⁰ (g lccpCRSPRW SLWStwapcs vlcsegsqRYRRCVGNNGq)

Inhibe la Hemólisis de rRBC Dependiente de la Vía Alternativa

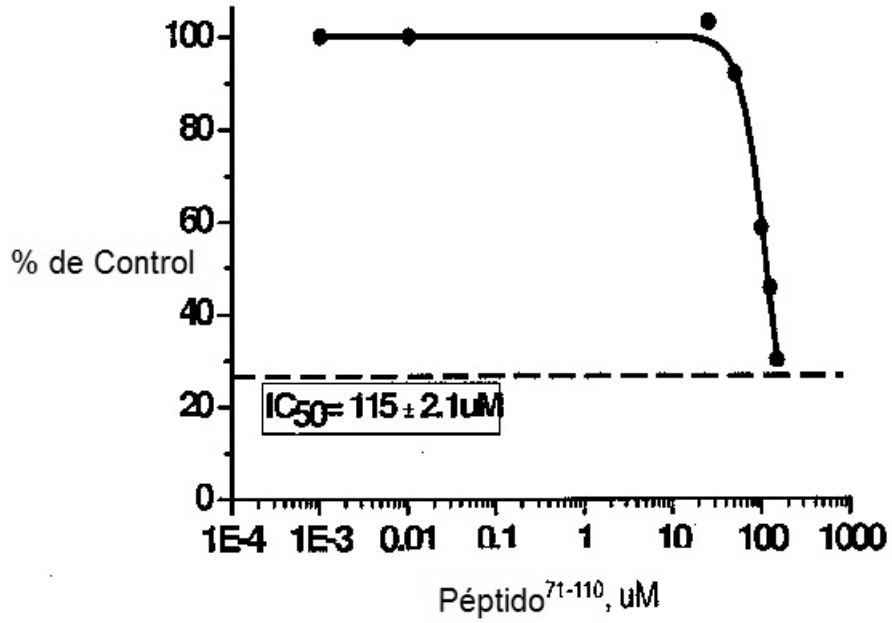


Fig. 9

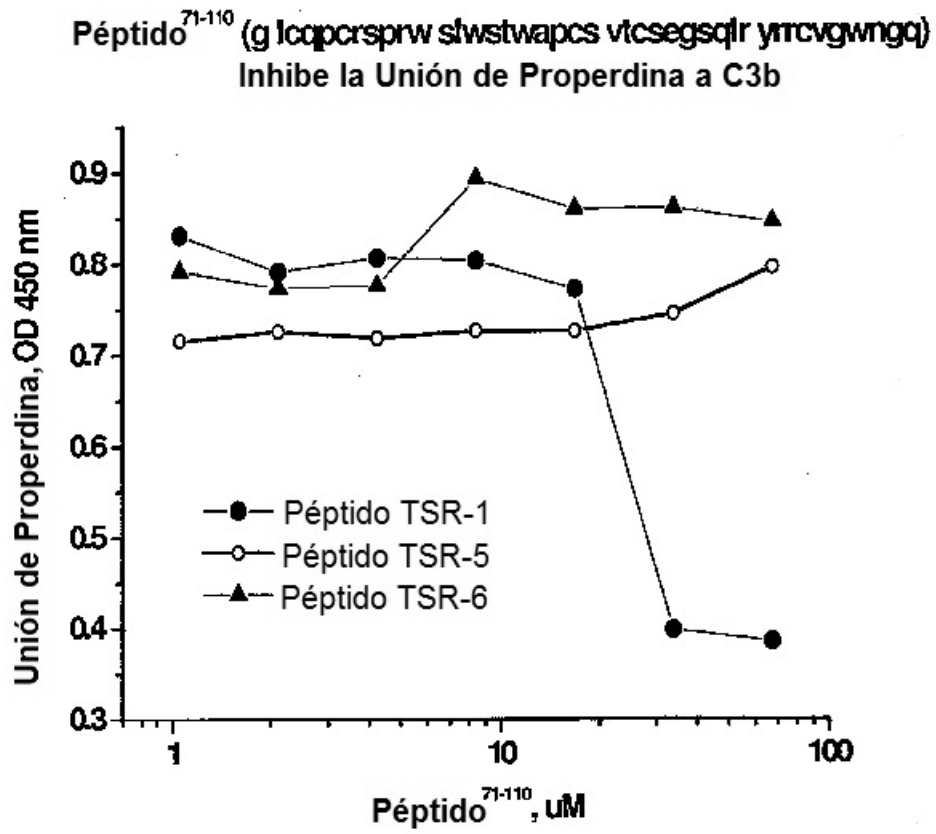


Fig. 10

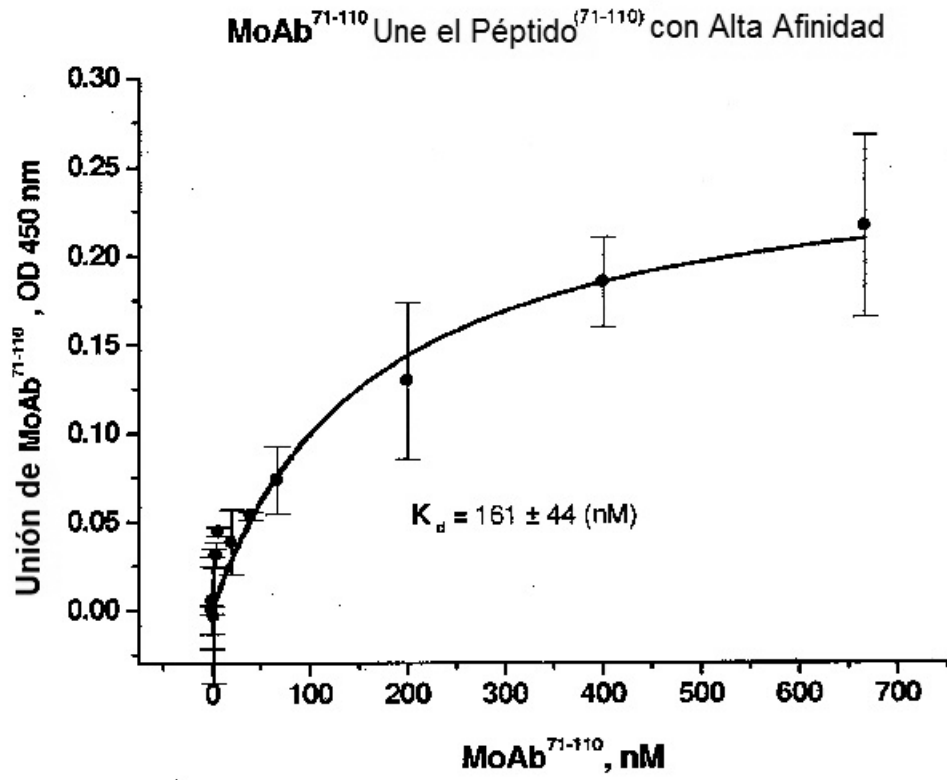


Fig. 11

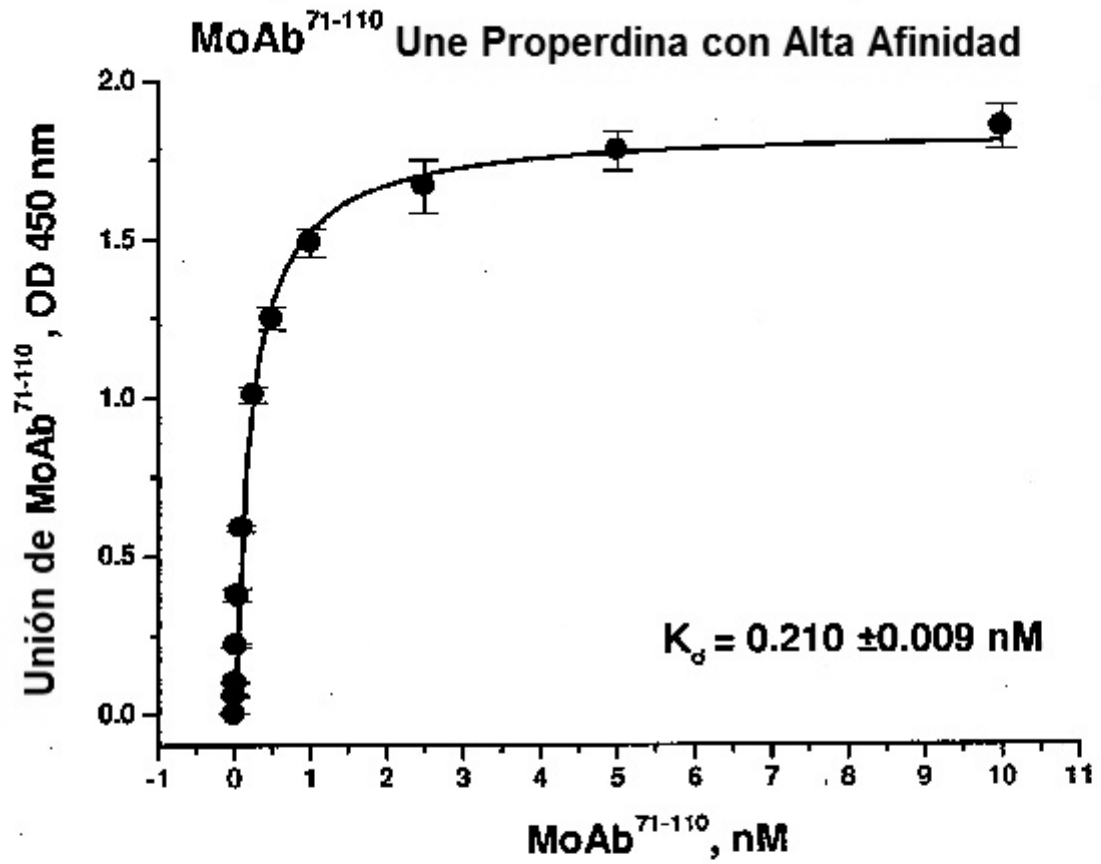


Fig. 12

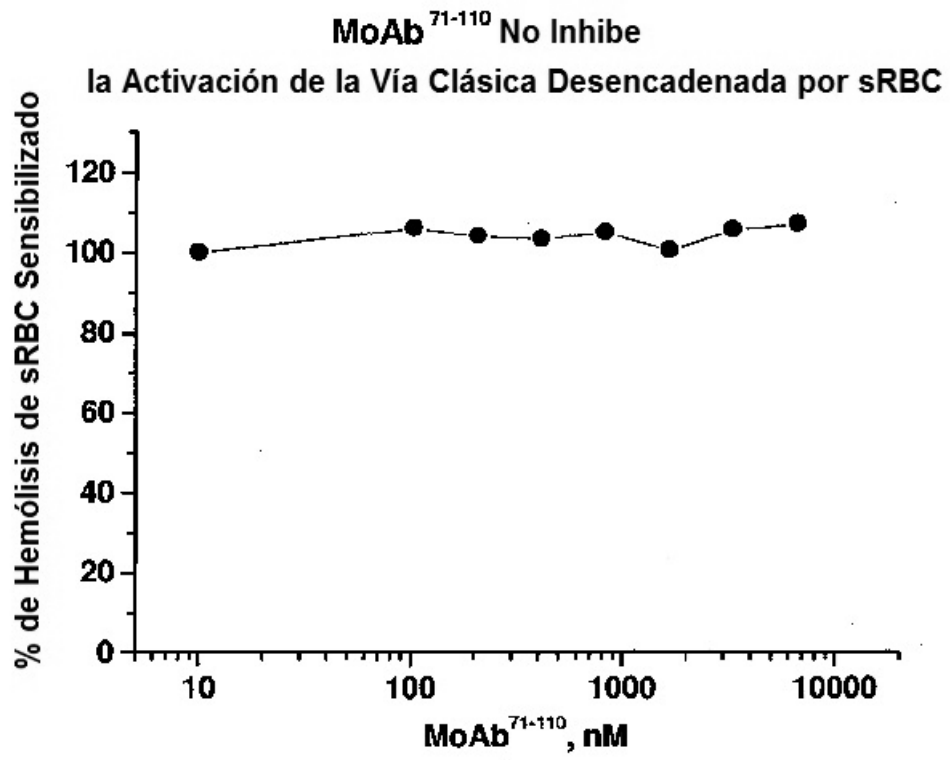


Fig. 13

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de la Vía Alternativa Desencadenada por rRBC

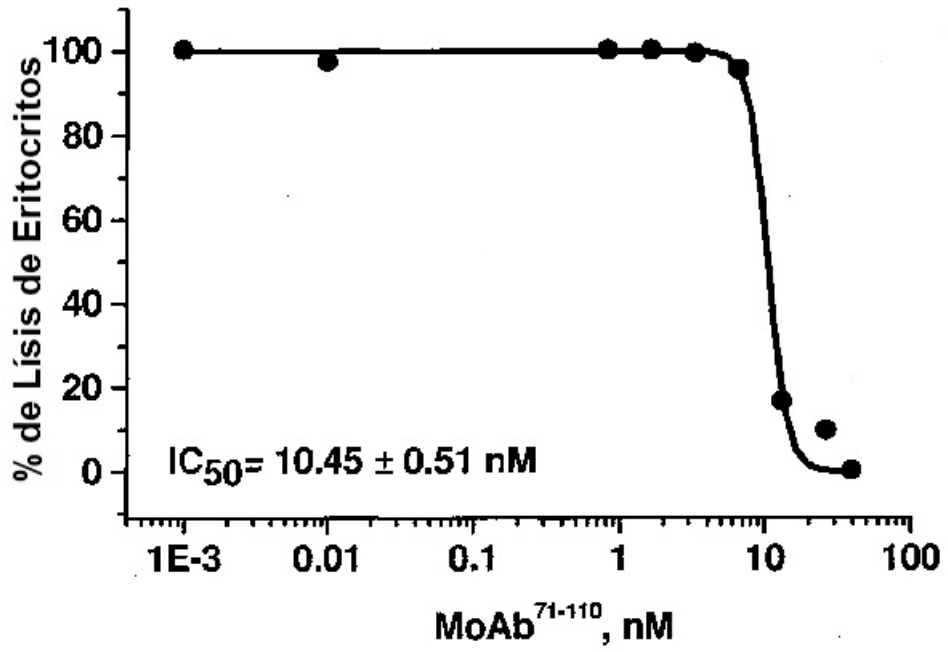


Fig. 14

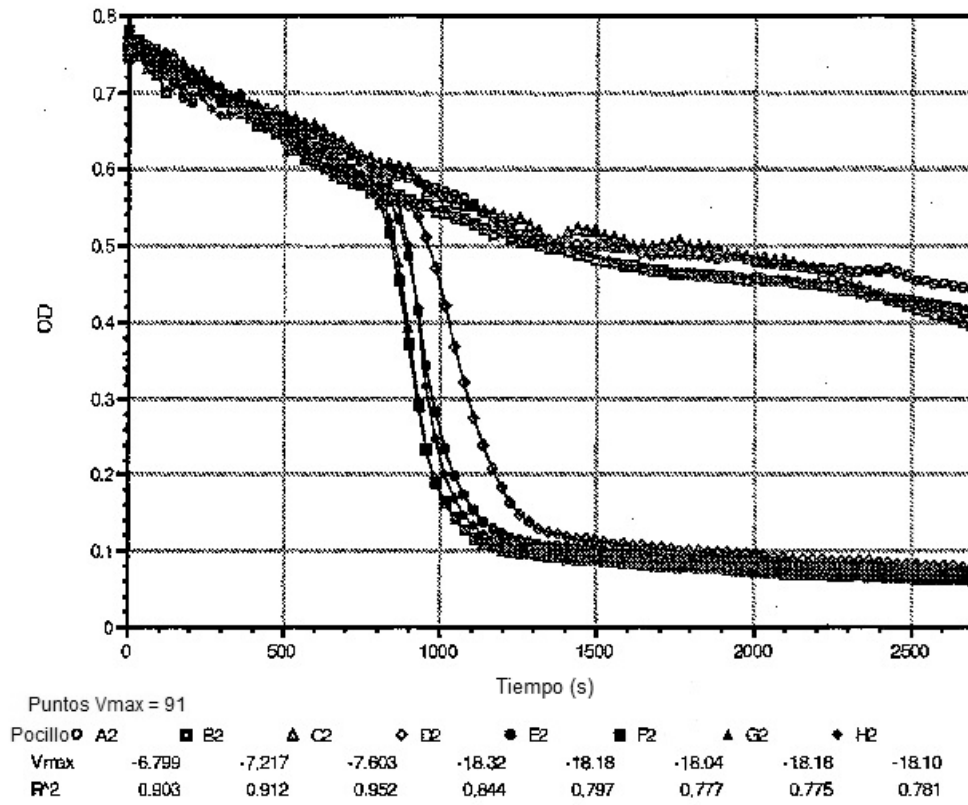


Fig. 15

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Neutraliza la activación de la Vía Alternativa en Suero Humano con una estequiometría 1:1 de Anticuerpo a Properdina

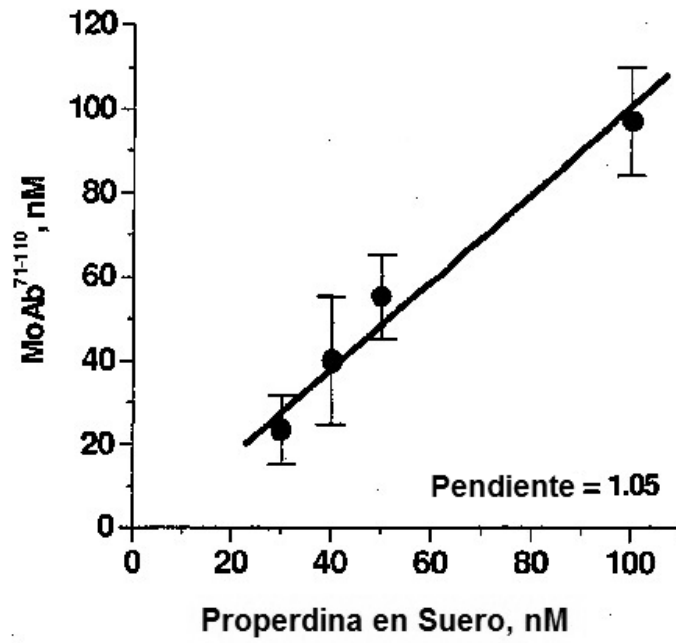


Fig. 16

**Factor B se Une a C3b Unida a Properdina con Alta Afinidad
Comparación Con C3b**

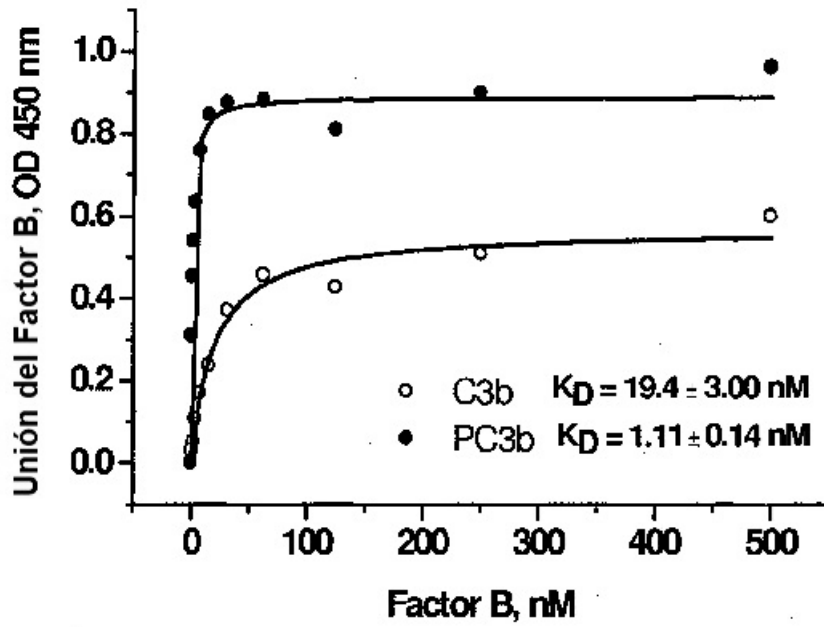


Fig. 17

Properdina Endógena se Une a C3b, iC3b, C3c, pero no a C3dg

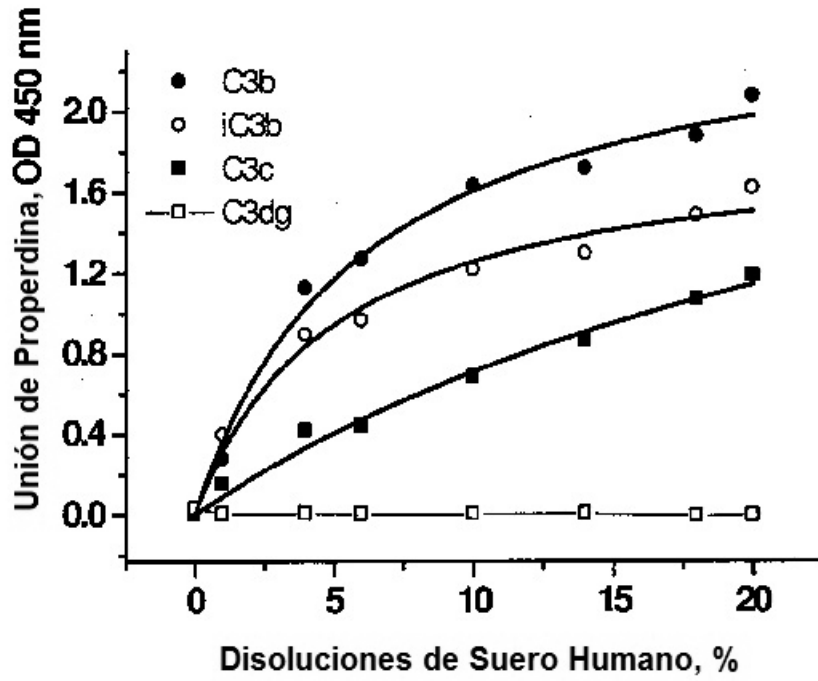


Fig. 18

**Factor B no se Une a iC3b, C3c y C3dg
Con o Sin Properdina**

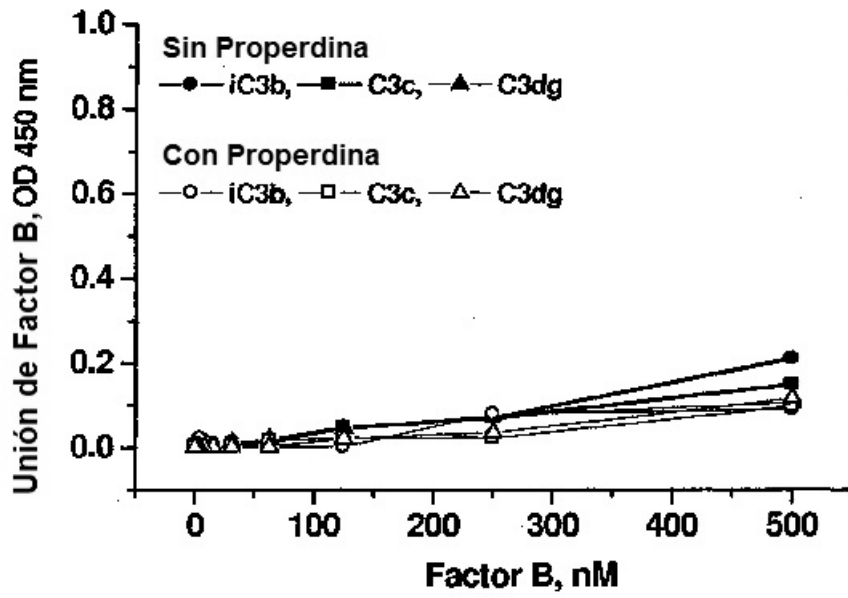


Fig. 19

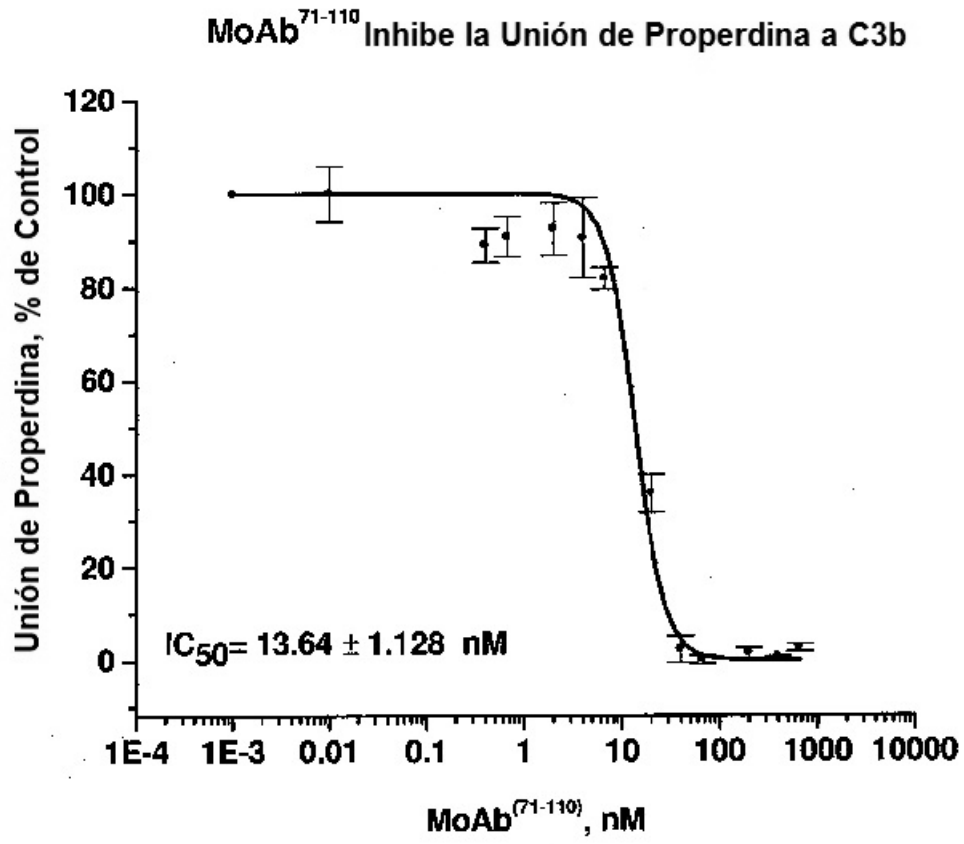


Fig. 20

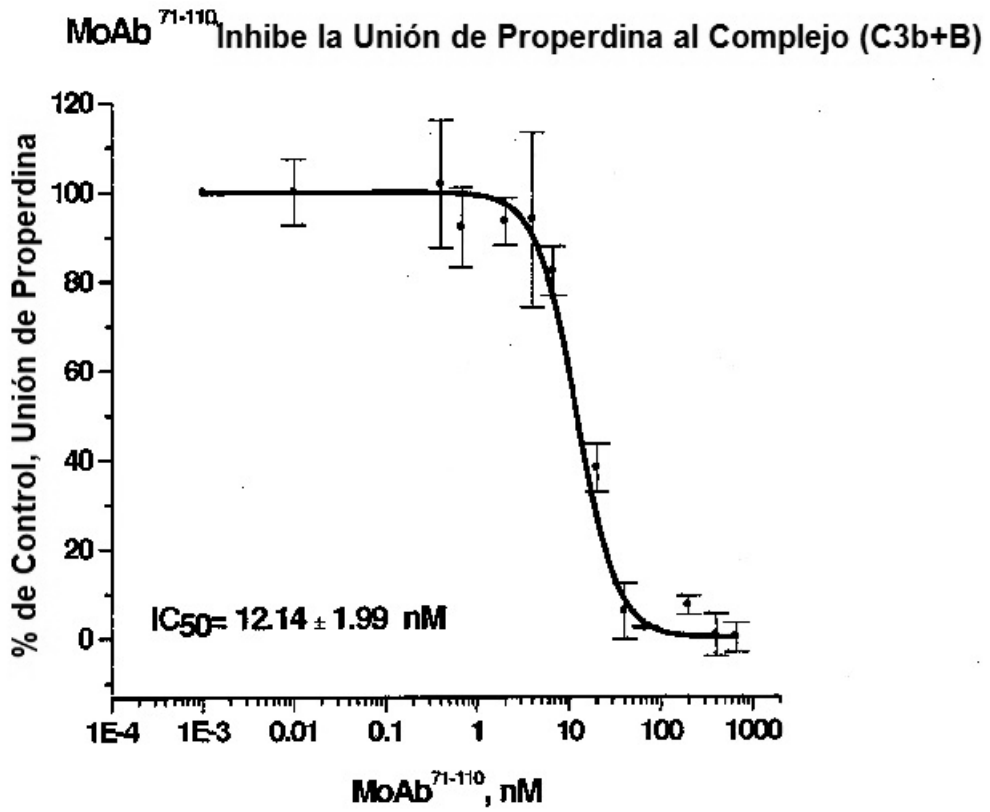


Fig. 21

Factor B No se Une a C3b en la Fase de Disolución

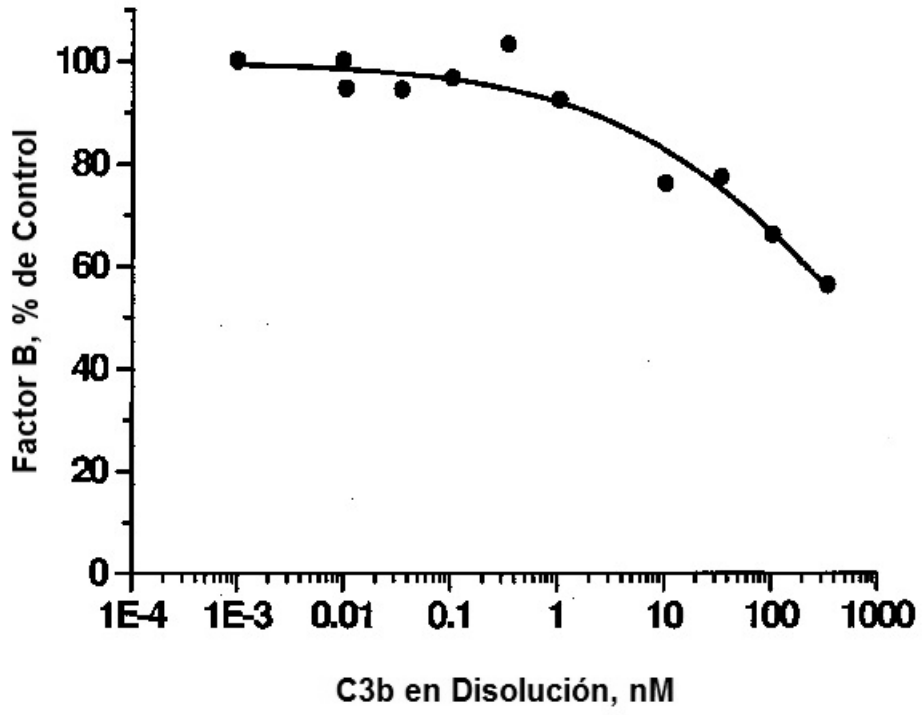


Fig. 22

**MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Formación de Convertasa AP C3 en suero Humano
Inhibición de la Deposición de C3b en Placas revestidas con LPS**

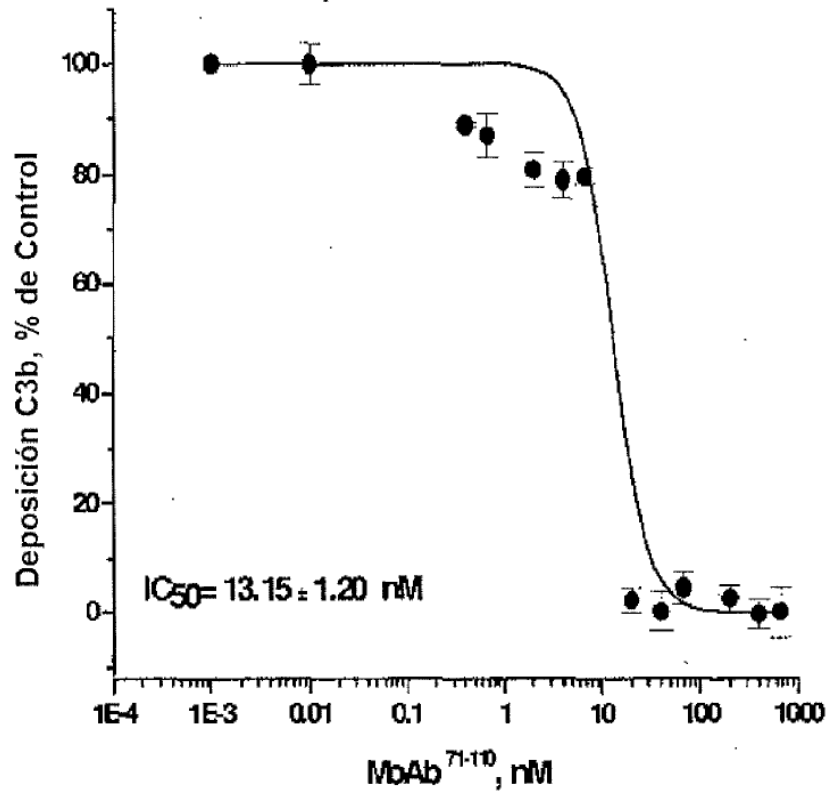


Fig. 23

**MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Formación de Convertasa AP C3 en suero Humano
Inhibición de la Deposición de C3b en Placas Revestidas con LPS**

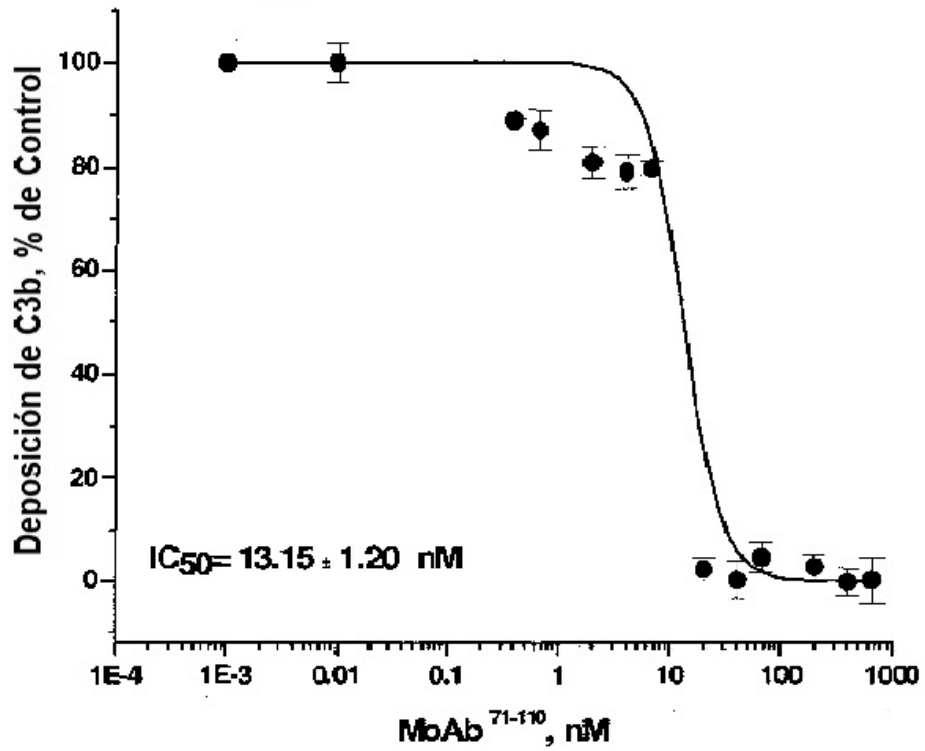


Fig. 24

**MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Formación de Convertasa AP C3 en suero Humano
Inhibición de la Deposición de Bb en Placas Revestidas con LPS**

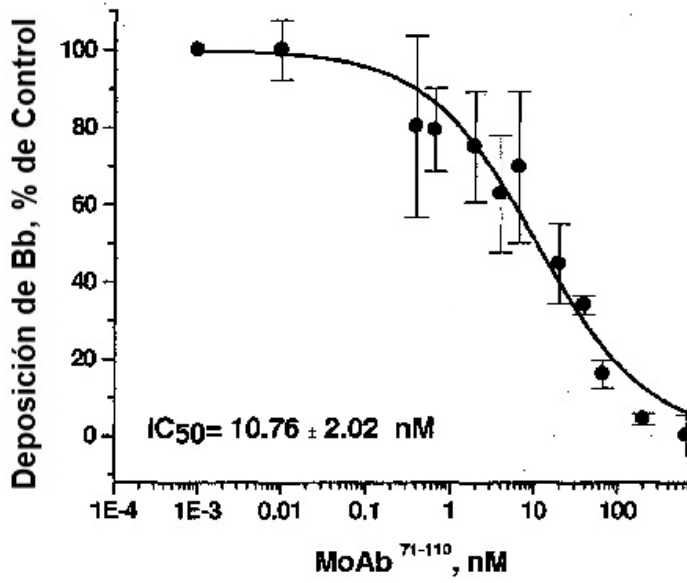


Fig. 25

MoAb⁽⁷¹⁻¹¹⁰⁾ Inhibe la Formación de AP C5b-9 (MAC) en suero Humano
Inhibición de la Deposición de C5b-9 en Placas Revestidas con LPS

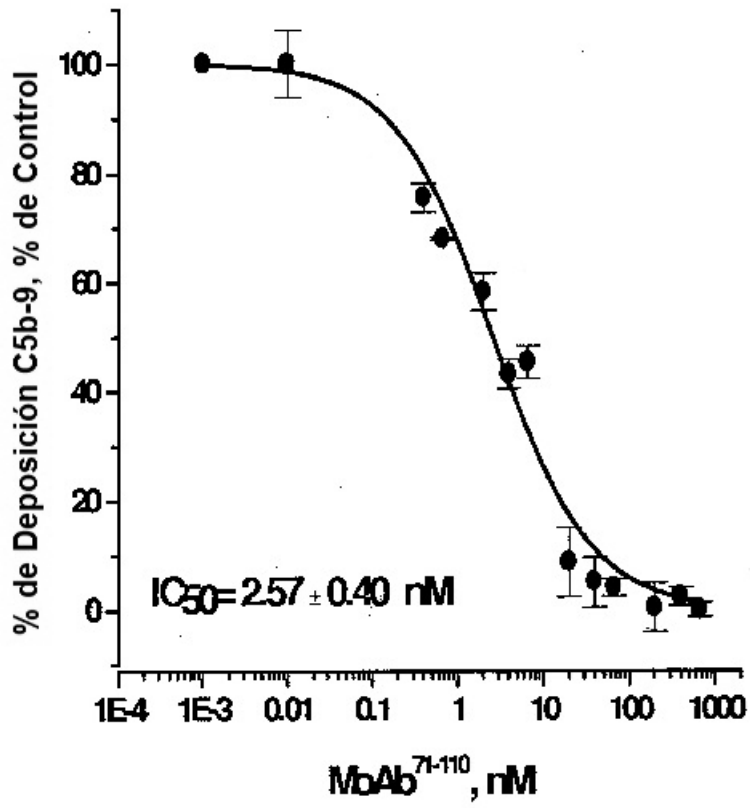


Fig. 26

MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Formación de C3a Durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

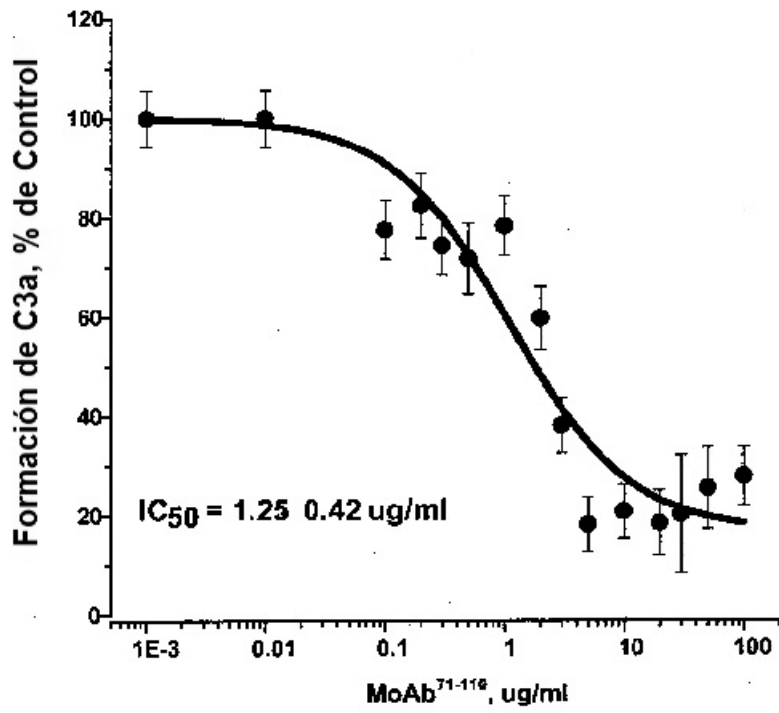


Fig. 27

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Formación de C5a Durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

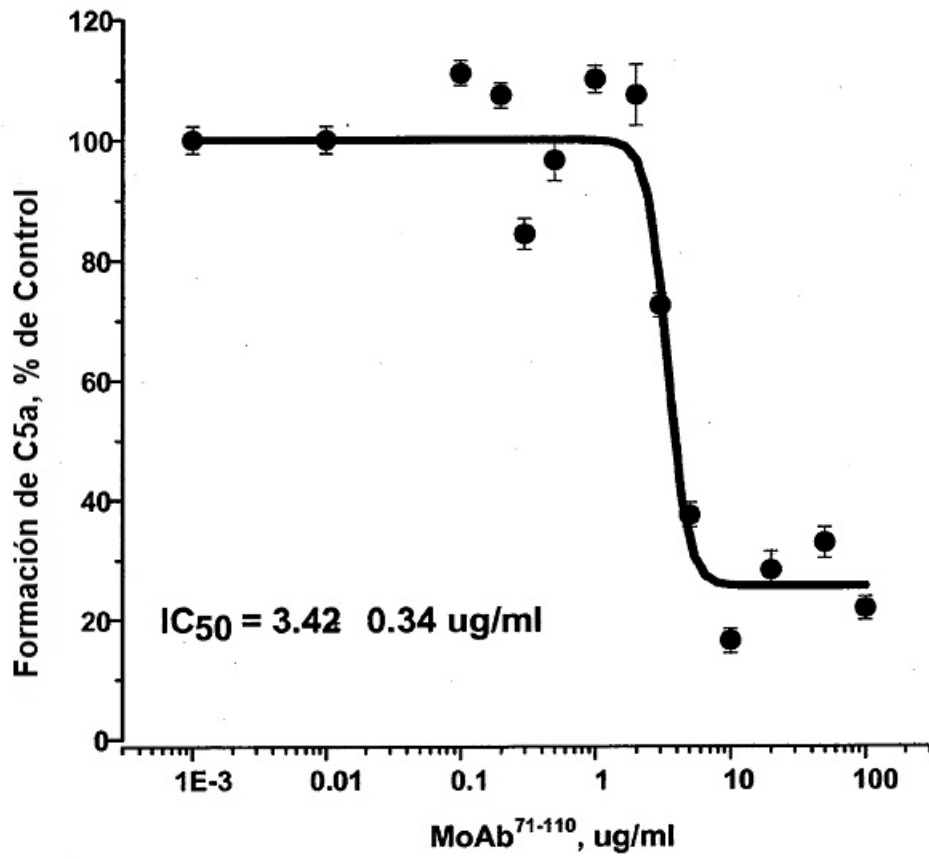


Fig. 28

MoAb 71-110 Inhibe la Formación de C5b-9 Durante la Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera Según se Demuestra por el Ensayo de Lisis de Eritrocitos del Conejo

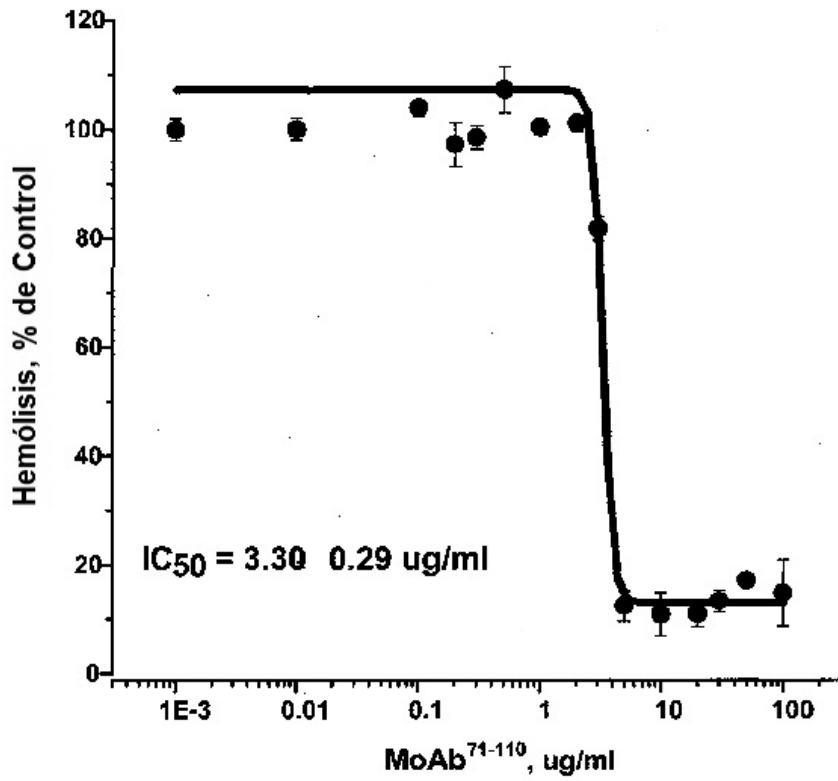


Fig. 29

MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de Neutrófilos Durante La Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

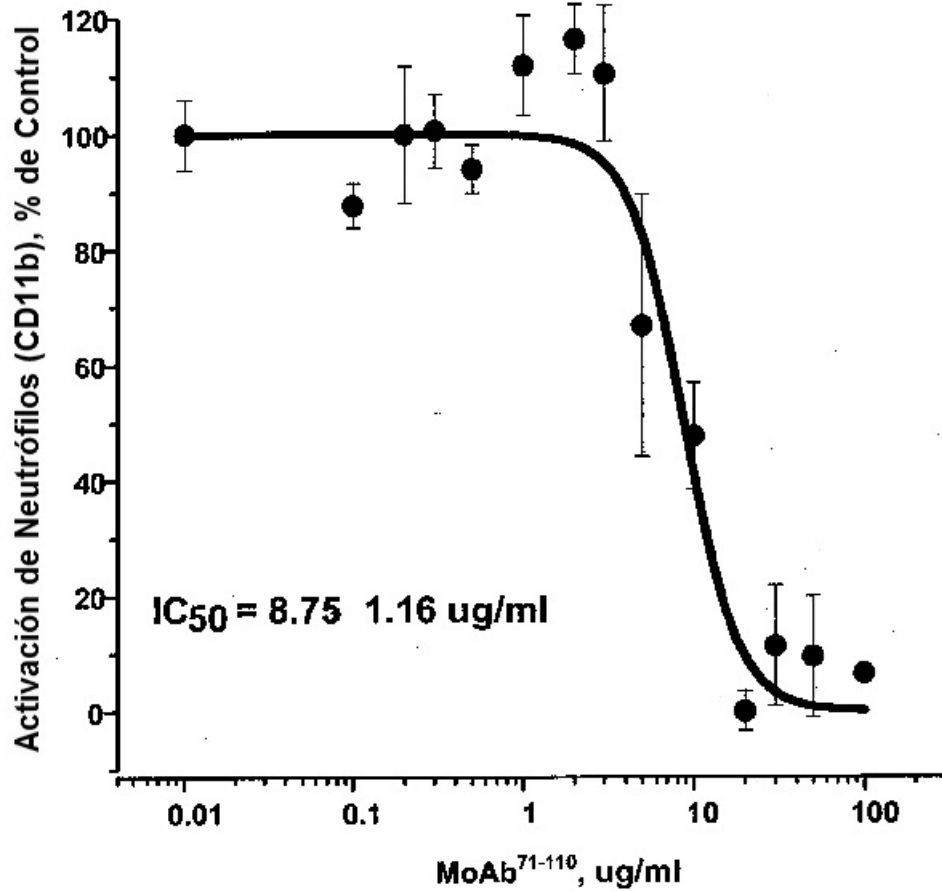


Fig. 30

**MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de Monocitos Durante
La Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera**

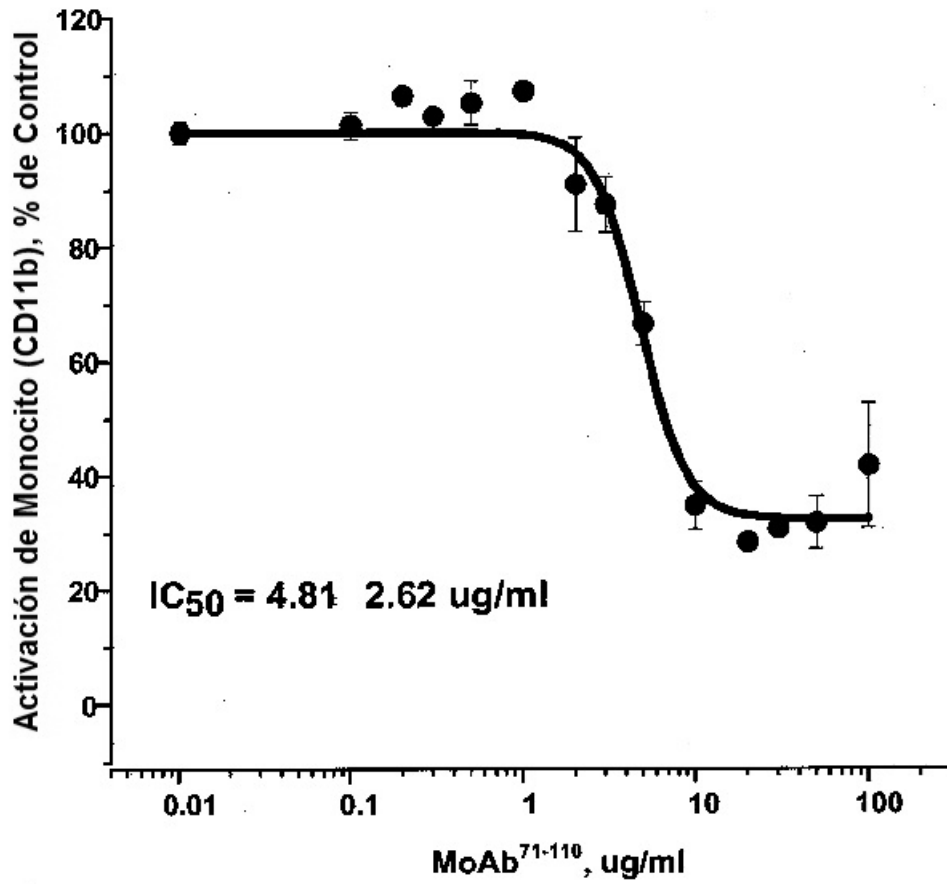


Fig. 31

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de Plaquetas Durante La Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

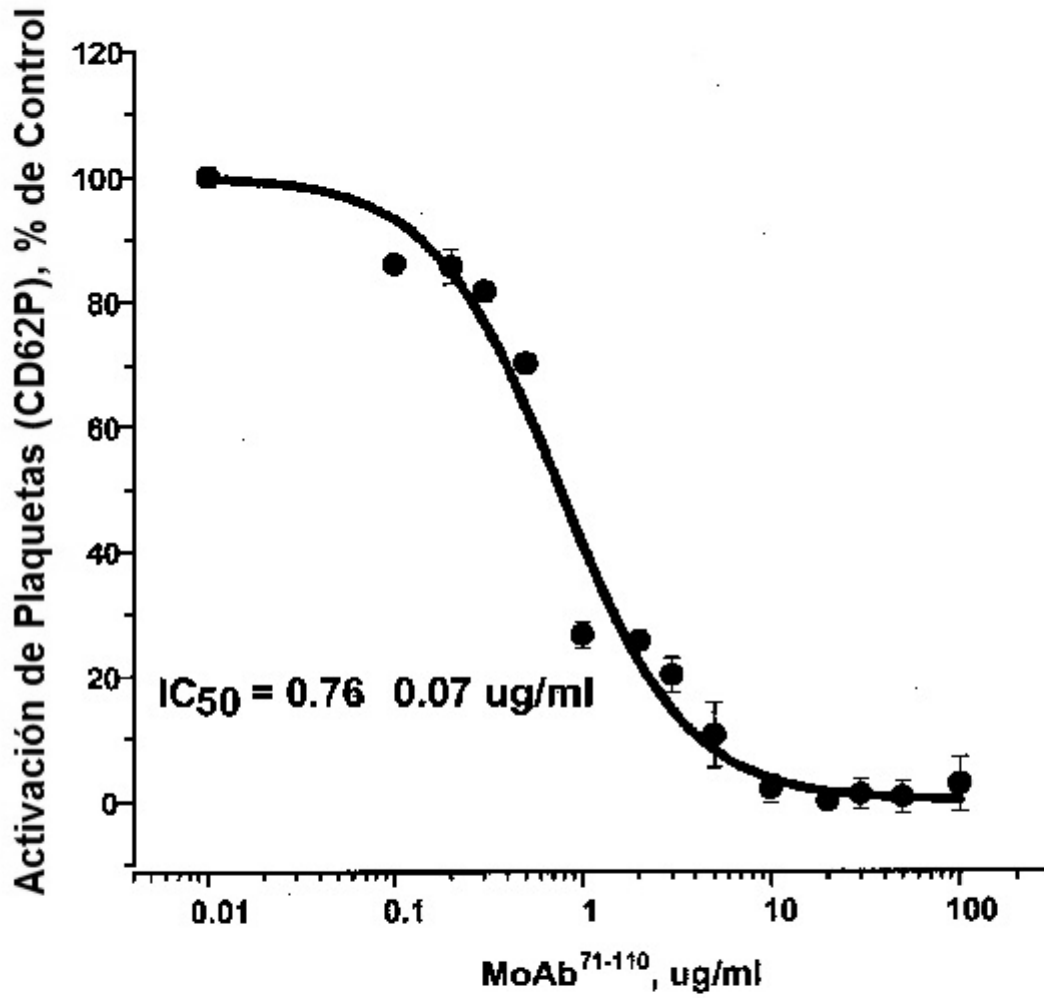


Fig. 32

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de Agregado Durante La Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

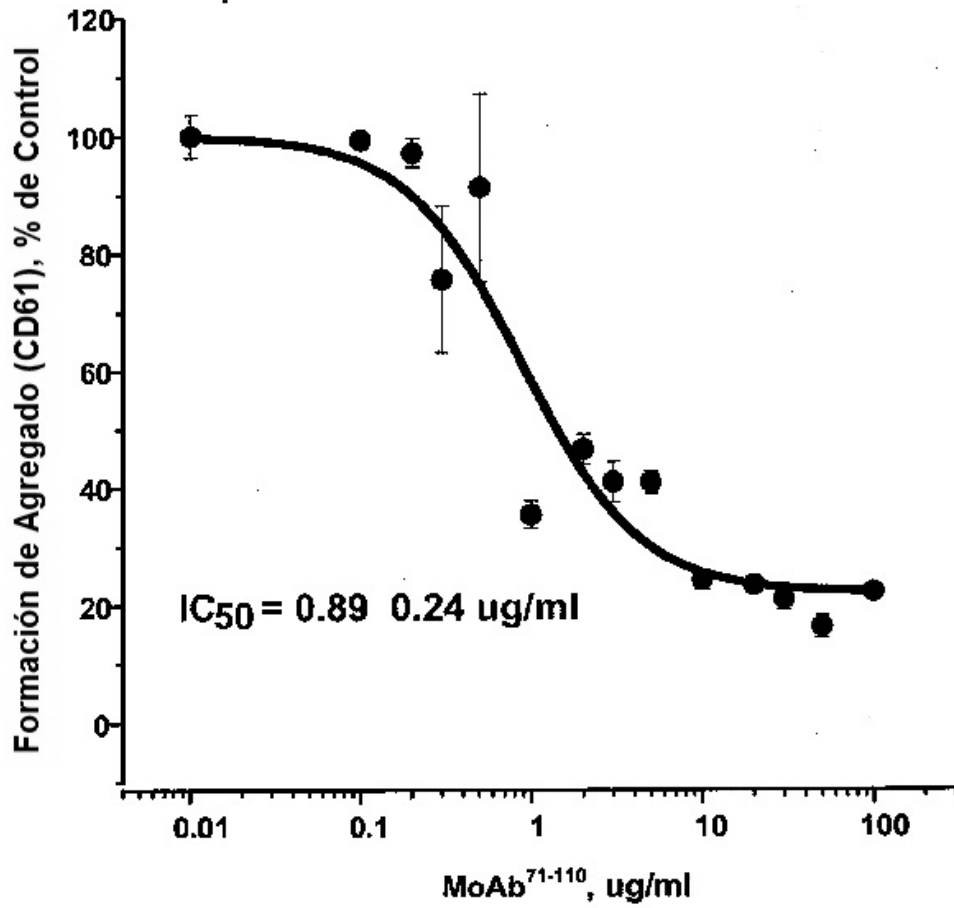


Fig. 33

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Activación de TNF-Alfa Durante La Circulación Extracorpórea de Sangre Humana Entera

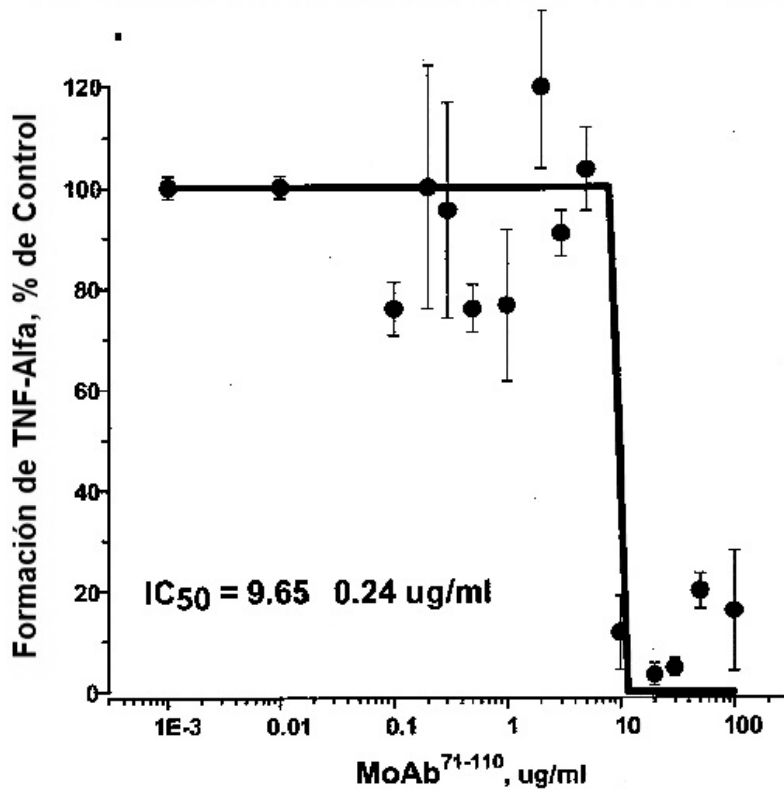


Fig. 34

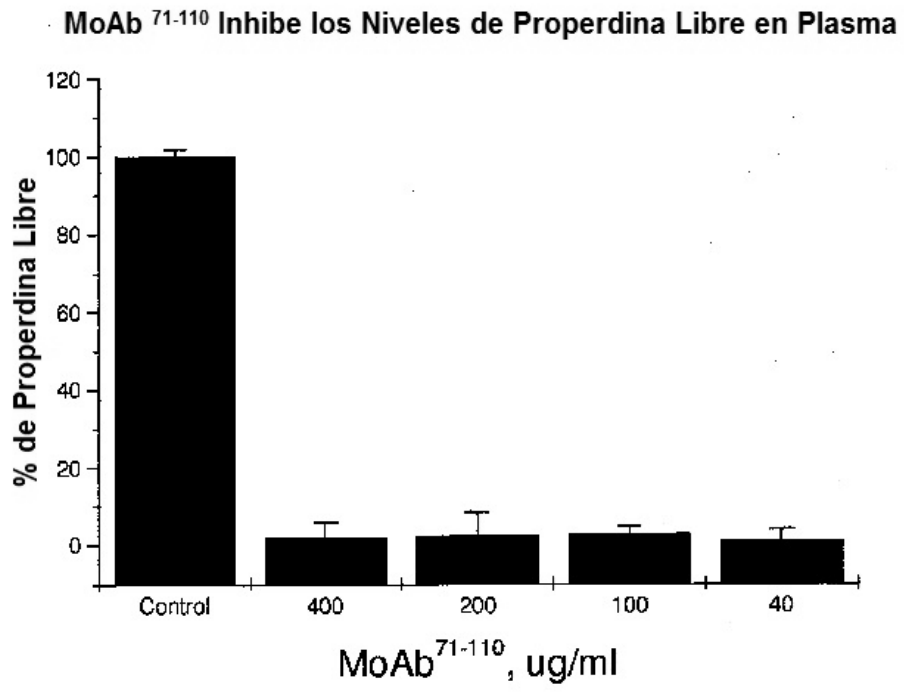


Fig. 35

MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Liberación de Neutrófilo Elastasa en la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera

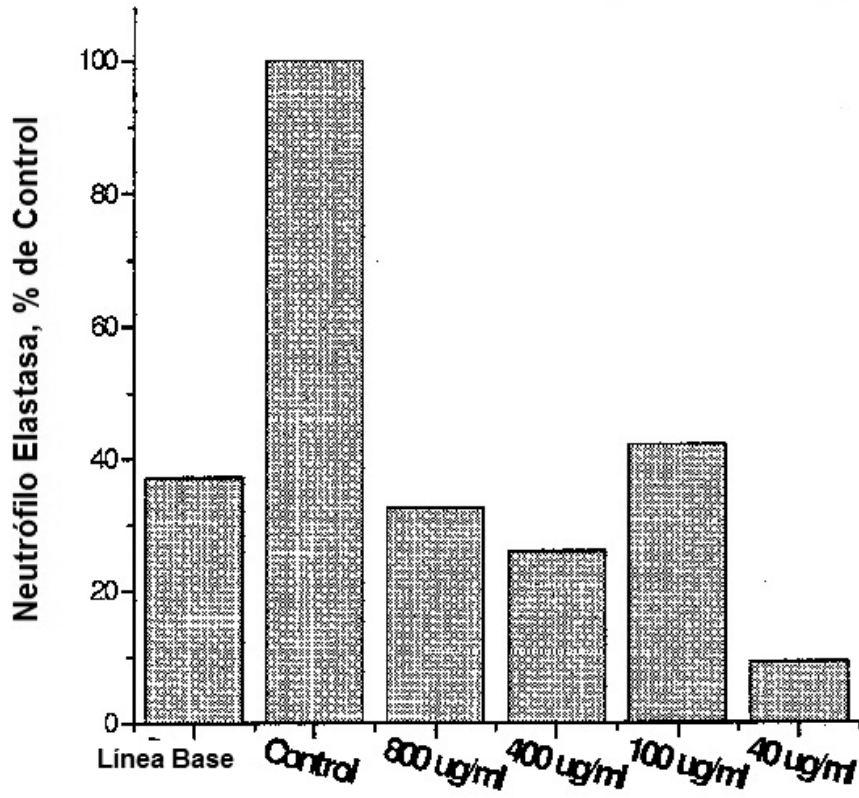


Fig. 36

**MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ Inhibe la Liberación de TNF-Alfa
en la Circulación Extracorpórea de Sangre Entera**

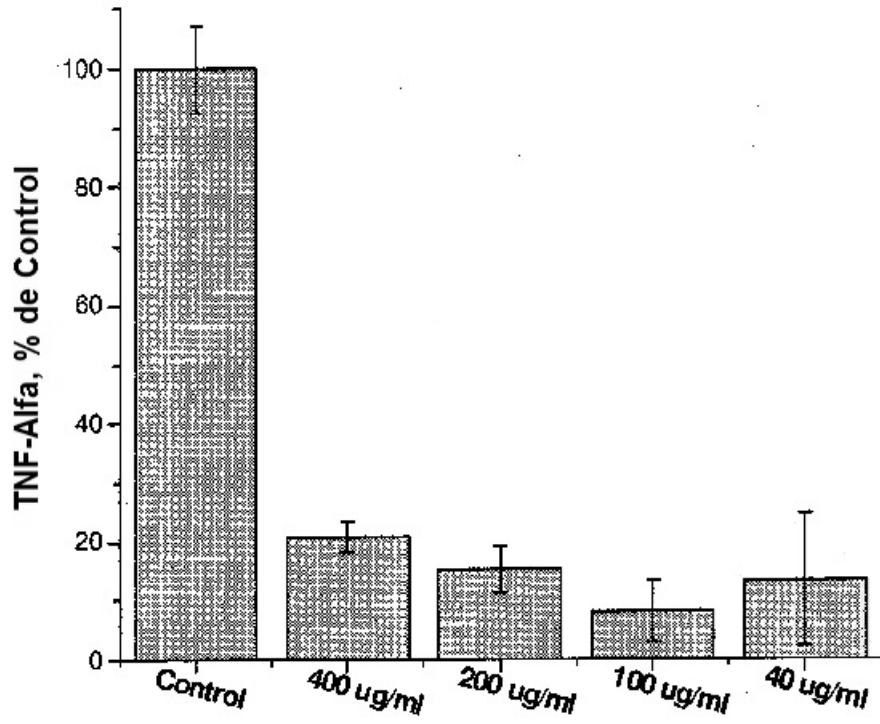


Fig. 37

Farmacodinámica de MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ en Conejos Evaluación de la Actividad de AP en Suero

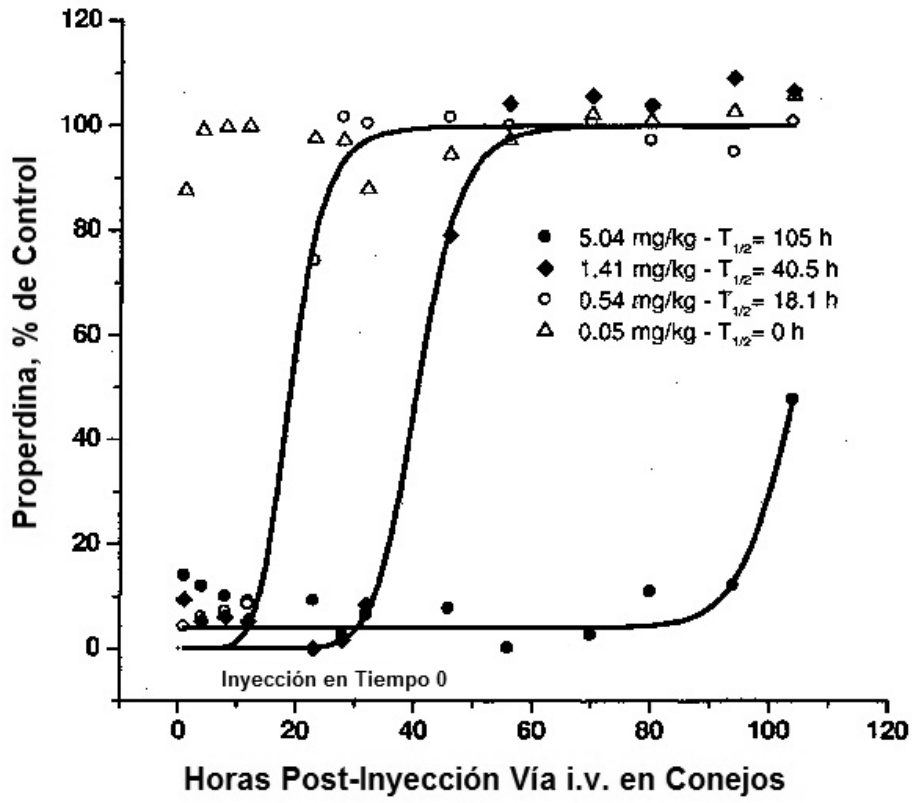


FIG. 38

Farmacodinámica de MoAb 71-110 en Conejos
Evaluación de Properdina libre en Tasa de Suero de la
Síntesis de Properdina

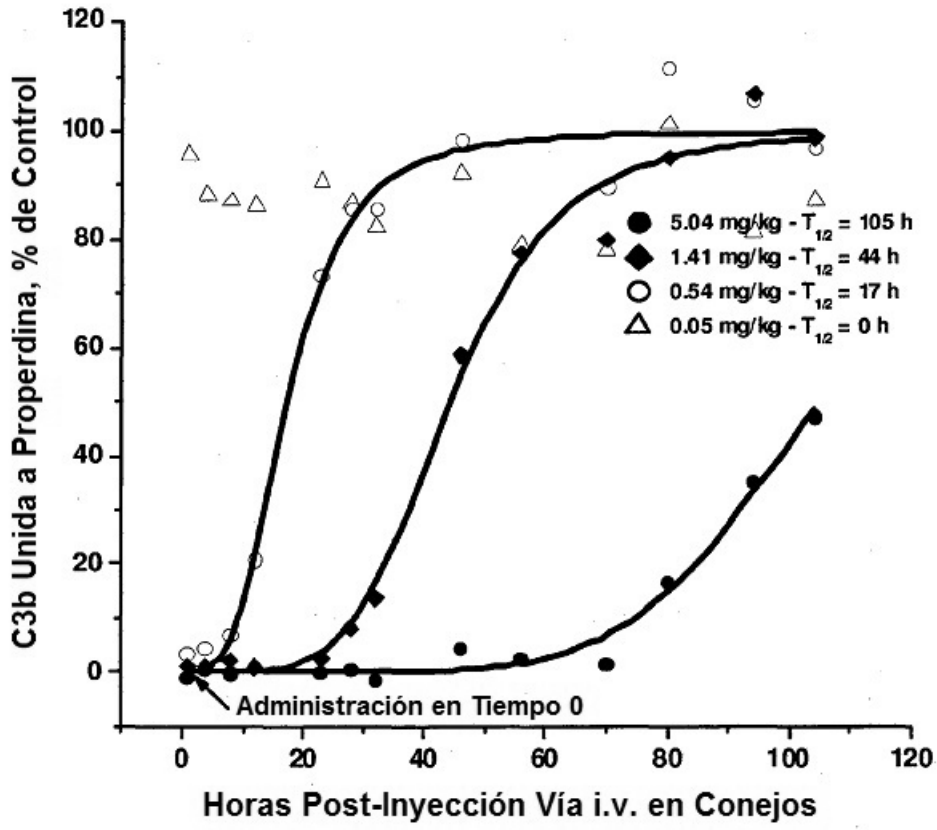


FIG. 39

La Duración de la Inhibición de la Actividad del Complemento es Linealmente Proporcional a la Concentración de MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰

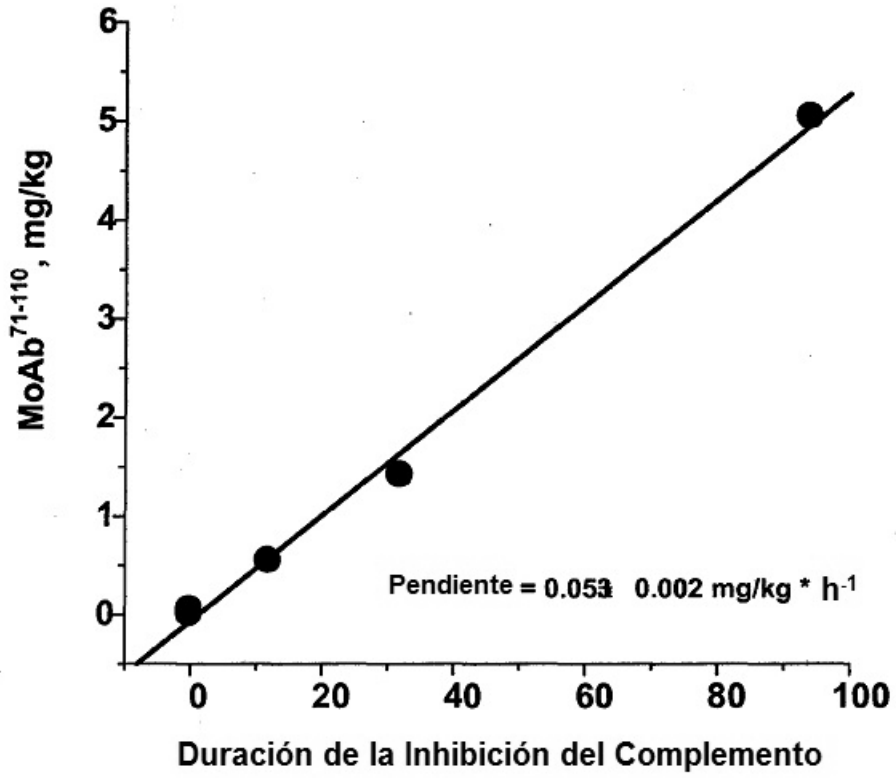


FIG. 40

Tasa de la Biosíntesis de Properdina en Conejos Administrados i.v. con Bolo de MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ : Retorno de la Actividad de AP con Síntesis de Properdina a Dosis de 0.54 mg/kg

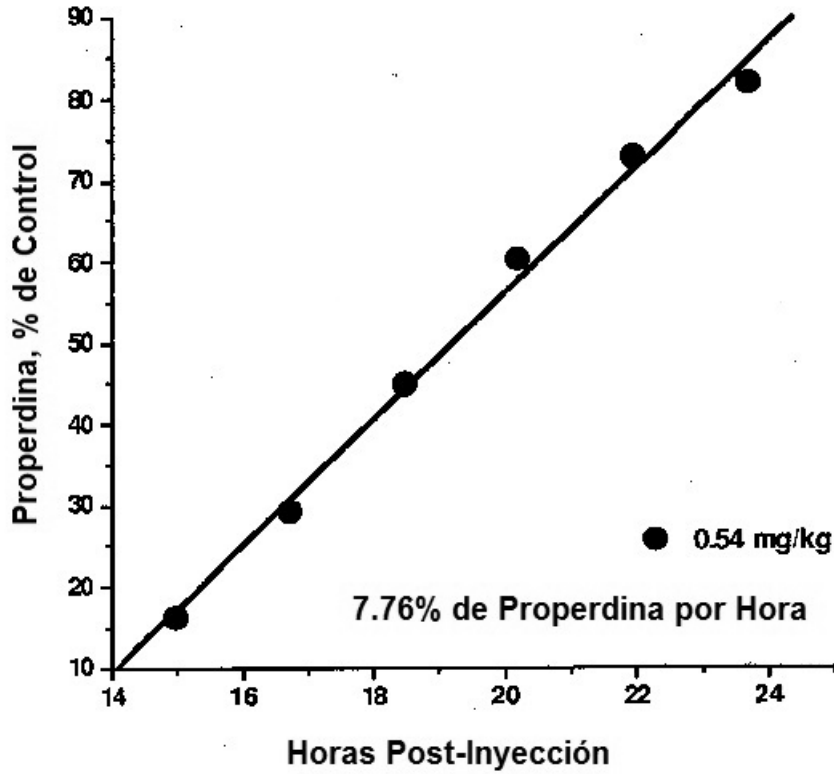


FIG. 41

**Tasa de la Biosíntesis de Properdina en
Conejos Administrados i.v. con Bolo
de MoAb ⁷¹⁻¹¹⁰ : Retorno de la Actividad de
AP con Síntesis de Properdina a Dosis
de 1.41 mg/kg**

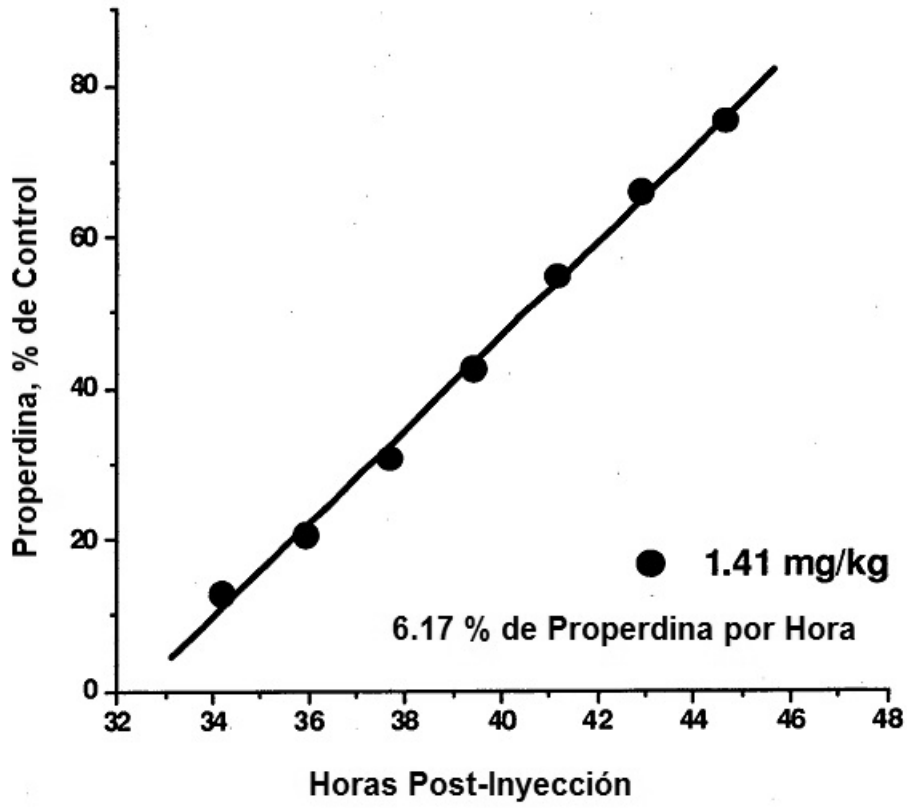


FIG. 42

Cinética de la desaparición de MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ en Suero de Conejo en Función del Tiempo

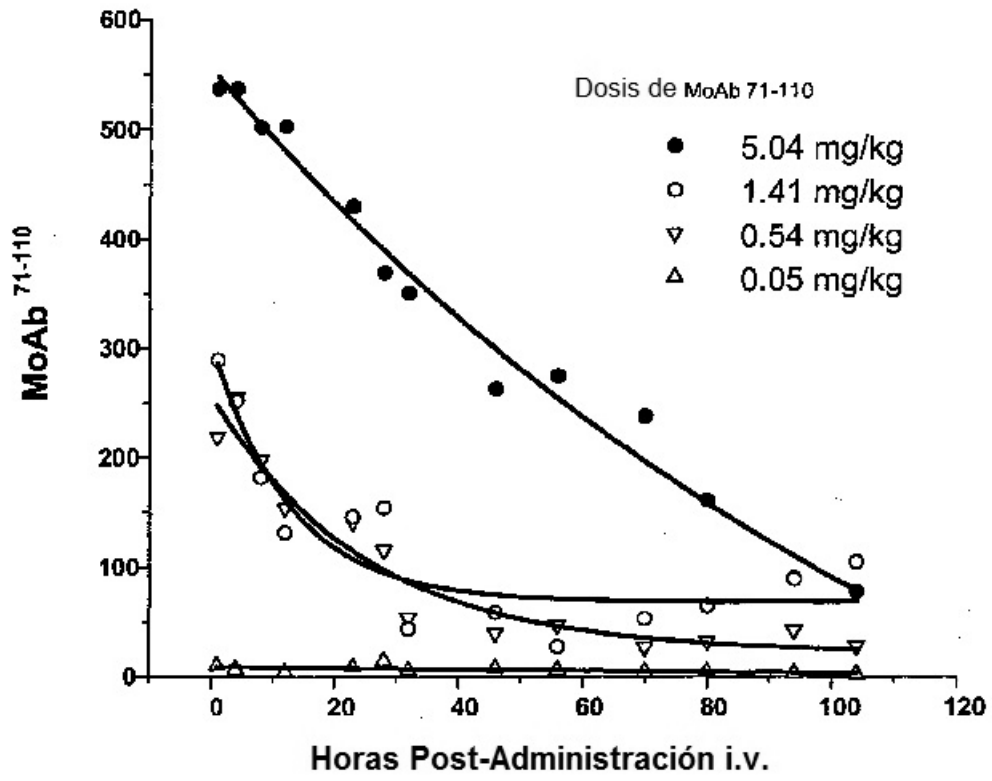


FIG. 43

MoAb⁷¹⁻¹¹⁰ No Inhibe la Deposición de C4d Dependiente de la Vía Clásica

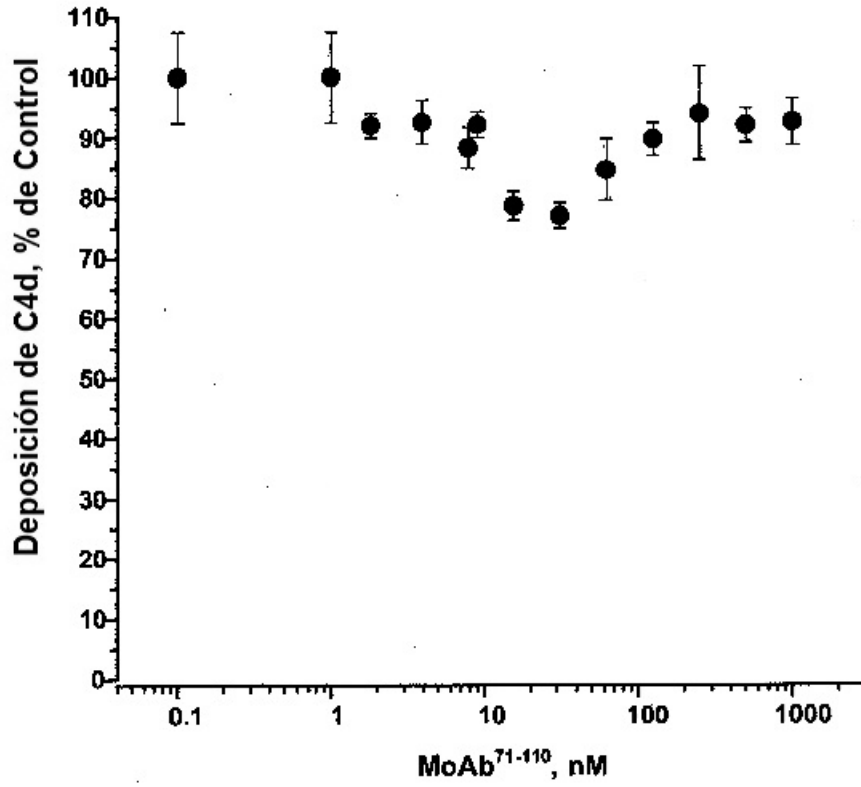


FIG. 44