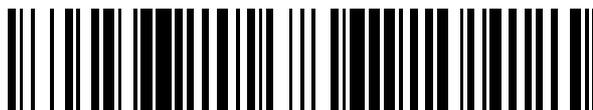


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 668**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013 PCT/US2013/035488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013 E 13798222 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2833907**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la MASP-1 y/o la MASP-3 para el tratamiento de la hemoglobinuria nocturna paroxísmica**

30 Prioridad:

**06.04.2012 US 201261621461 P**

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

**31.05.2018**

73 Titular/es:

**OMEROS CORPORATION (50.0%)**

**201 Elliott Avenue West**

**Seattle, WA 98119, US y**

**UNIVERSITY OF LEICESTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHWAEBLE, HANS-WILHELM y**

**DEMOPULOS, GREGORY, A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 670 668 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

Composiciones y métodos para inhibir la MASP-1 y/o la MASP-3 para el tratamiento de la hemoglobinuria nocturna paroxística

## Antecedentes

5 El sistema del complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar, amplificar y orquestar la respuesta inmunitaria a la infección microbiana y otros ataques agudos (M.K. Liszewski y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York), en humanos y otros vertebrados. Si bien la activación del complemento proporciona una valiosa defensa de primera línea contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inmunitaria protectora también pueden representar una amenaza potencial para el hospedador (K.R. Kalli, y colaboradores, *Springer Semin. Immunopathol.* 15: 417- 431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.*, 24: 219 - 228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos C3 y C5 reclutan y activan neutrófilos. Aunque es indispensable para la defensa del hospedador, los neutrófilos activados son indiscriminados en su liberación de enzimas destructivas y pueden causar daño a los órganos. Además, la activación del complemento puede causar el depósito de los componentes del complemento lítico en las células hospedadoras cercanas, así como en los objetivos microbianos, lo que resulta en la lisis de la célula hospedadora.

Al sistema del complemento también se lo ha implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades agudas y crónicas, que incluyen: infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ARDS [*Acute respiratory distress syndrome*, síndrome de dificultad respiratoria aguda], lesión por reperfusión, choque séptico, filtración capilar después de quemaduras térmicas, inflamación de *bypass* poscardiopulmonar, rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave y enfermedad de Alzheimer. En casi todas estas afecciones, el complemento no es la causa, sino uno de los diversos factores involucrados en la patogénesis. Sin embargo, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto eficaz para el control clínico en muchos de estos estados patológicos. El creciente reconocimiento de la importancia de la lesión tisular mediada por el complemento en una variedad de enfermedades pone de manifiesto la necesidad de hallar fármacos inhibidores del complemento que resulten efectivos. Hasta la fecha, el eculizumab (Solaris®), un anticuerpo contra C5, es el único fármaco dirigido al complemento que ha sido aprobado para uso humano. Sin embargo, C5 es una de las diversas moléculas efectoras localizadas “corriente abajo” en el sistema del complemento, y el bloqueo de C5 no inhibe la activación del sistema del complemento. Por lo tanto, un inhibidor de las etapas de iniciación de la activación del complemento tendría ventajas significativas sobre un inhibidor del complemento “corriente abajo”.

En la actualidad, está ampliamente aceptado que el sistema del complemento se puede activar a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía de la lectina y la vía alternativa. La vía clásica generalmente se desencadena por un complejo compuesto por anticuerpos del hospedador, unidos a una partícula extraña (es decir, un antígeno) y, por lo tanto, requiere una exposición previa a un antígeno para la generación de una respuesta de anticuerpos específica. Dado que la activación de la vía clásica depende de una respuesta inmunitaria adaptativa previa por parte del hospedador, la vía clásica es parte del sistema inmunitario adquirido. Por el contrario, tanto la vía de la lectina como la vía alternativa son independientes de la inmunidad adaptativa y forman parte del sistema inmunitario innato.

La activación del sistema del complemento da como resultado la activación secuencial de los zimógenos de la serina proteasa. El primer paso en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a moléculas de IgG e IgM unidas al antígeno. La C1q está asociada con las proenzimas de la serina proteasa C1r y C1s, como un complejo llamado C1. Tras la unión de C1q a un complejo inmunitario, la escisión autoproteolítica del sitio Arg-Ile de C1r antecede a la escisión mediada por C1r y a la activación de C1s, que de ese modo adquiere la capacidad de escindir C4 y C2. C4 se divide en dos fragmentos, designados como C4a y C4b, y, de manera similar, C2 se divide en C2a y C2b. Los fragmentos C4b son capaces de formar enlaces covalentes con los grupos hidroxilo o amino adyacentes y generar la C3 convertasa (C4b2a), mediante la interacción no covalente con el fragmento C2a del C2 activado. La C3 convertasa (C4b2a) activa a C3 mediante escisión proteolítica en los subcomponentes C3a y C3b, lo cual conduce a la generación de la C5 convertasa (C4b2a3b), que, al escindir C5 conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b combinado con C6, C7, C8 y C-9, también conocido como “MAC” [*membrane attack complex*, complejo de ataque a la membrana]) que puede alterar las membranas celulares, dando como resultado la lisis celular. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan covalentemente en las superficies diana extrañas, que son reconocidas por los receptores del complemento en múltiples fagocitos.

Independientemente, la primera etapa en la activación del sistema del complemento a través de la vía de la lectina es también la unión de moléculas de reconocimiento específicas, que es seguida por la activación de las proenzimas de la serina proteasa asociadas. Sin embargo, en lugar de la unión de complejos inmunes por C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de la lectina comprenden un grupo de proteínas de unión a carbohidratos (lectina de unión al manano (MBL, *mannan-binding lectin*), H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina y la lectina del tipo C, CL-11), denominadas colectivamente lectinas. Ver J. Lu y colaboradores, *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 387 - 400, (2002); Holmskov y otros, *Annu. Rev. Immunol.* 21: 547 - 578 (2003); Teh y colaboradores, *Immunology* 101: 225 - 232 (2000)). Ver

también J. Luet y col., *Biochim Biophys Acta* 1572: 387-400 (2002); Holmskov y col., *Annu Rev Immunol* 21: 547 - 578 (2003); Teh y colaboradores, *Immunology* 101: 225 - 232 (2000); Hansen y otros, *J. Immunol* 185 (10): 6096 - 6104 (2010).

Ikeda y colaboradores fueron los primeros en demostrar que, al igual que C1q, la MBL podría activar el sistema del complemento tras la unión a eritrocitos recubiertos con manano de levadura de una manera dependiente de C4 (Ikeda y col., *J Biol. Chem.* 262: 7451-7454, (1987)). La MBL, un miembro de la familia de proteínas colectina, es una lectina dependiente del calcio que se une a los carbohidratos con grupos 3- y 4-hidroxi orientados en el plano ecuatorial del anillo de piranosa. Los ligandos prominentes para la MBL son, por lo tanto, D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no se ajustan a este requerimiento estérico tienen una afinidad indetectable por la MBL (Weis y colaboradores, *Nature* 360: 127-134, (1992)). La interacción entre la MBL y los azúcares monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación típicamente en el intervalo milimolar de un solo dígito. La MBL consigue una unión específica y estrecha a los ligandos de glucano por avidéz, es decir, interactuando simultáneamente con múltiples residuos de monosacáridos localizados muy próximos entre sí (Lee y colaboradores, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 299: 129-136, (1992)). La MBL reconoce los patrones de los carbohidratos que comúnmente decoran microorganismos tales como bacterias, levaduras, parásitos y ciertos virus. Por el contrario, la MBL no reconoce a la D-galactosa ni al ácido siálico, los penúltimos y últimos azúcares que generalmente decoran los glicoconjugados complejos "maduros" presentes en el plasma de los mamíferos y las glicoproteínas de la superficie celular. Se cree que esta especificidad vinculante promueve el reconocimiento de superficies "extrañas" y ayuda a protegerse de la "autoactivación". Sin embargo, la MBL sí se une con una gran afinidad a grupos de glicanos "precursores" con un alto contenido de manosa en glicoproteínas ligadas a N y glicolípidos secuestrados en el retículo endoplásmico y Golgi de las células de los mamíferos (Maynard y col., *J Biol. Chem.* 257: 3788-3794, (1982)). Además, se ha demostrado que la MBL puede unirse a los polinucleótidos, ADN y ARN, que pueden estar expuestos en células necróticas y apoptóticas (Palaniyar y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1010: 467-470 (2003); Nakamura y otros, *J. Leuk. Biol.* 86: 737-748 (2009)). Por lo tanto, las células dañadas son objetivos potenciales para la activación de la vía de la lectina a través de la unión de MBL.

Las ficolinas poseen un tipo diferente de dominio de lectina que la MBL, llamado dominio del tipo fibrinógeno. Las ficolinas se unen a los residuos de azúcar en una forma independiente del  $Ca^{++}$ . En los humanos, se han identificado tres tipos de ficolinas (L-ficolina, M-ficolina y H-ficolina). Las dos ficolinas séricas, L-ficolina y H-ficolina, tienen en común una especificidad para la N-acetil-D-glucosamina; sin embargo, la H-ficolina también se une a la N-acetil-D-galactosamina. La diferencia en la especificidad del azúcar de la L-ficolina, la H-ficolina, CL-11 y la MBL significa que las diferentes lectinas pueden ser complementarias y dirigirse a glicoconjugados diferentes, aunque superpuestos. Este concepto está respaldado por el reciente informe que dice que, de las lectinas conocidas en la vía de la lectina, solo la L-ficolina se une específicamente al ácido lipoteicoico, un glicoconjugado de la pared celular que se encuentra en todas las bacterias Gram-positivas (Lynch y col., *J. Immunol.* 172: 1198 - 1202, (2004)). Además de los restos de azúcares acetilados, las ficolinas también se pueden unir a aminoácidos y polipéptidos acetilados (Thomsen y colaboradores, *Mol. Immunol.* 48 (4): 369 - 81 (2011)). Las colectinas (es decir, MBL) y las ficolinas no tienen una similitud significativa en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones similares de dominio y, al igual que C1q, se ensamblan en estructuras oligoméricas, que maximizan la posibilidad de unión a múltiples sitios.

Las concentraciones séricas de MBL son muy variables en poblaciones sanas, y esto está genéticamente controlado por polimorfismos/mutaciones, tanto en el promotor como en las regiones codificantes del gen MBL. Como una proteína de fase aguda, la expresión de MBL se regula aún más durante la inflamación. La L-ficolina está presente en el suero en concentraciones similares a las de la MBL. Por lo tanto, la rama de L-ficolina de la vía de la lectina es potencialmente comparable con la rama de MBL en cuanto a la resistencia. La MBL y las ficolinas también pueden funcionar como opsoninas, que permiten que los fagocitos puedan dirigirse a superficies decoradas con MBL y ficolina (ver Jack y colaboradores, *J Leukoc Biol.*, 77 (3): 328-36 (2004), Matsushita y Fujita, *Immunobiology*, 205 (4 - 5): 490 - 7 (2002), Aoyagi y col., *J. Immunol.*, 174 (1): 418 - 25 (2005). Esta opsonización requiere la interacción de estas proteínas con los receptores de fagocitos (Kuhlman y colaboradores, *J. Exp. Med.* 169:1733, (1989); Matsushita y otros, *J. Biol. Chem.* 271: 2448-54, (1996)), cuya identidad no ha sido establecida.

La MBL humana forma una interacción específica y de alta afinidad a través de su dominio del tipo colágeno con las proteasas de la serina del tipo C1r/C1s únicas, denominadas serina proteasas asociadas a MBL (MASP, MBL-associated serine proteases). Hasta la fecha, se han descrito tres MASP. En primer lugar, se identificó y caracterizó una sola enzima "MASP" como la enzima responsable del inicio de la cascada del complemento (es decir, de la escisión de C2 y C4) (Matsushita y colaboradores, *J Exp Med* 176 (6): 1497-1502 (1992); Ji y col., *J. Immunol.*, 150: 571 - 578, (1993)). Posteriormente se determinó que la actividad de la MASP era, de hecho, una mezcla de dos proteasas: MASP-1 y MASP-2 (Thiel y colaboradores, *Nature* 386: 506-510, (1997)). Sin embargo, se demostró que el complejo MBL-MASP-2 solo es suficiente para la activación del complemento (Vorup-Jensen y col., *J. Immunol.*, 165: 2093-2100, (2000)). Además, solo la MASP-2 escindió C2 y C4 con altos índices (Ambrus y colaboradores, *J. Immunol.* 170: 1374-1382, (2003)). Por lo tanto, la MASP-2 es la proteasa responsable de activar C4 y C2 para generar la C3 convertasa, C4b2a. Esta es una diferencia significativa respecto del complejo C1 de la vía clásica, donde la acción coordinada de dos serina proteasas específicas (C1r y C1s) conduce a la activación del sistema del complemento. Además, se ha aislado una tercera proteasa nueva, la MASP-3 (Dahl, M.R., y col., *Immunity* 15: 127-

35, 2001). La MASP-1 y MASP-3 son productos del mismo gen empalmados alternativamente.

Las MASP comparten organizaciones de dominio idénticas con las de C1r y C1s, los componentes enzimáticos del complejo C1 (Sim y colaboradores, *Biochem. Soc. Trans.* 28: 545, (2000)). Estos dominios incluyen un dominio N-terminal C1r/C1s/erizo VEGF/proteína morfogénica ósea (CUB), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico, un segundo dominio CUB, un tándem de dominios de proteína de control del complemento y un dominio de serina proteasa. Como en las proteasas C1, la activación de la MASP-2 se produce mediante la escisión de un enlace Arg-Ile adyacente al dominio de serina proteasa, que divide la enzima en cadenas A y B unidas por disulfuro, donde esta última consiste en el dominio de serina proteasa.

La MBL también puede asociarse con una forma de MASP-2 empalmada alternativamente, conocida como proteína asociada a MBL de 19 kDa (MAp19) o proteína asociada a MBL pequeña (sMAP, *small MBL-associated protein*), que carece de la actividad catalítica de MASP-2. (Stover, *J. Immunol.* 162: 3481 - 90, (1999); Takahashi y col., *Int. Immunol.*, 11: 859 - 863, (1999)). La MAp19 comprende los dos primeros dominios de MASP-2, seguidos por una secuencia adicional de cuatro aminoácidos únicos. La función de Map19 no está clara (Degn y colaboradores, *J. Immunol. Methods*, 2011). La MASP-1 y los genes de la MASP-2 se encuentran localizados en los cromosomas humanos 3 y 1, respectivamente (Schwaeble y colaboradores, *Immunobiology* 205: 455 - 466, (2002)).

Varias líneas de evidencia sugieren que existen diferentes complejos de MBL-MASP, y una gran fracción de las MASP en el suero no forma complejo con la MBL (Thiel, y col., *J. Immunol.*, 165: 878-887, (2000)). Tanto la H- como la L-ficolina se unen a todas las MASP y activan la vía del complemento de la lectina, al igual que la MBL (Dahl y colaboradores, *Immunity* 15: 127-35, (2001); Matsushita y col., *J. Immunol.* 168: 3502- 3506, (2002)). Tanto la lectina como las vías clásicas forman una C3 convertasa común (C4b2a) y las dos vías convergen en esta etapa.

Es una creencia común que la vía de la lectina desempeña un papel importante en la defensa del hospedador frente a la infección en el hospedador sano. Una fuerte evidencia de la participación de la MBL en la defensa del hospedador proviene del análisis de pacientes con menores niveles séricos de MBL funcional (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 401-413, (2002)). Tales pacientes denotan susceptibilidad a las infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Estos síntomas generalmente se evidencian en las primeras etapas de la vida, durante una aparente ventana de vulnerabilidad a medida que disminuye el título de los anticuerpos derivados de la médula ósea, pero antes de que se desarrolle el repertorio completo de las respuestas de los anticuerpos. Este síndrome a menudo resulta de mutaciones en varios sitios en la porción de colágeno de la MBL, que interfieren con la formación adecuada de oligómeros de MBL. Sin embargo, dado que la MBL puede funcionar como una opsonina independiente del complemento, no se sabe en qué medida la mayor susceptibilidad a la infección se debe a la alteración de la activación del complemento.

A diferencia de la vía clásica y de la vía de la lectina, no se ha encontrado previamente ningún iniciador de la vía alternativa que cumpla las funciones de reconocimiento que la C1q y las lectinas realizan en las otras dos vías. Hoy en día, está muy aceptado el concepto de que la vía alternativa sufre espontáneamente un bajo nivel de activación, que puede amplificarse con facilidad en superficies extrañas u otras anormales (bacterias, levaduras, células infectadas con virus o tejido dañado) que carecen de los elementos moleculares adecuados que mantienen activación espontánea del complemento bajo control. Hay cuatro proteínas plasmáticas directamente involucradas en la activación de la vía alternativa: C3, los factores B y D y la properdina.

Aunque existe una amplia evidencia que implica tanto a la vía clásica como a la alternativa del complemento en la patogénesis de las enfermedades humanas no infecciosas, el papel de la vía de la lectina apenas comienza a evaluarse. Estudios recientes proporcionan evidencia de que la activación de la vía de la lectina puede ser la responsable de la activación del complemento y la inflamación relacionada en la lesión por isquemia/reperfusión. Collard y colaboradores (2000) informaron que las células endoteliales cultivadas sometidas a estrés oxidante se unen a la MBL y muestran depósito de C3 tras la exposición al suero humano (Collard y colaboradores, *Am. J. Pathol.*, 156: 1549 - 1556, (2000)). Además, el tratamiento de sueros humanos con anticuerpos monoclonales anti-MBL bloqueadores inhibió la unión de MBL y la activación del complemento. Estos hallazgos se extendieron a un modelo de rata de isquemia de miocardio-reperfusión, en el que las ratas tratadas con un anticuerpo bloqueador dirigido contra MBL de rata mostraron un daño miocárdico significativamente menor tras la oclusión de una arteria coronaria, que las ratas tratadas con un anticuerpo de control (Jordan y colaboradores, *Circulation* 104: 1413 - 1418, (2001)). El mecanismo molecular de la unión de MBL al endotelio vascular después del estrés oxidante no está claro; un estudio reciente sugiere que la activación de la vía de la lectina después del estrés oxidante puede estar mediada por la unión de MBL a las citoqueratinas endoteliales vasculares, y no a los glicoconjugados (Collard y colaboradores, *Am. J. Pathol.* 159: 1045-1054, (2001)). Otros estudios han implicado a las vías clásica y alternativa en la patogénesis de la lesión por isquemia/reperfusión y el papel de la vía de la lectina en esta enfermedad sigue siendo controvertido (Riedermann, N.C., y col., *Am. J. Pathol.* 162: 363-367, 2003).

Estudios recientes han demostrado que la MASP-1 y la MASP-3 convierten el factor D de la enzima de activación de la vía alternativa de su forma de zimógeno a su forma enzimáticamente activa (véase Takahashi M. y col., *J Exp Med* 207 (1): 29-37 (2010), Iwaki y col., *J. Immunol.* 187: 3751-58 (2011)). La importancia fisiológica de este proceso se ve acentuada por la ausencia de actividad funcional de la vía alternativa en el plasma de ratones con deficiencia

en MASP-1/3. Se requiere la generación proteolítica de C3b a partir de la C3 nativa para que funcione la vía alternativa. Dado que la C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como una subunidad esencial, la cuestión sobre el origen del primer C3b mediante la vía alternativa ha presentado un problema desconcertante y ha estimulado una considerable investigación.

5 La C3 pertenece a una familia de proteínas (junto con C4 y la macroglobulina  $\alpha$ -2) que contienen una rara modificación postraduccion conocida como enlace tioéster. El grupo tioéster está compuesto por una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal forma un enlace tioéster covalente con el grupo sulfhidrilo de una cisteína a tres aminoácidos de distancia. Este enlace es inestable, y el glutamilo-tioéster electrófilo puede reaccionar con restos nucleofílicos, tales como grupos hidroxilo o amino y así formar un enlace covalente con otras moléculas. El enlace  
10 tioéster es razonablemente estable cuando está secuestrado dentro de un bolsillo hidrofóbico de la C3 intacta. Sin embargo, la escisión proteolítica de C3 a C3a y C3b da como resultado la exposición del enlace tioéster altamente reactivo en C3b y, después del ataque nucleofílico por parte de los restos adyacentes que comprenden grupos hidroxilo o amino, C3b se une covalentemente a un objetivo. Además de su papel bien documentado en la unión covalente de C3b a las dianas del complemento, también se cree que el tioéster C3 tiene un papel fundamental en el  
15 desencadenamiento de la vía alternativa. De acuerdo con la ampliamente aceptada "teoría *tick-over*", la vía alternativa se inicia con la generación de una convertasa en fase fluida, iC3Bb, que se forma a partir de C3 con tioéster hidrolizado (iC3; C3 (H<sub>2</sub>O)) y factor B (Lachmann, P.J., y col., *Springer Semin. Immunopathol.*, 7: 143 - 162, (1984)). El C3 (H<sub>2</sub>O) de tipo C3b se genera a partir de C3 nativo mediante una hidrólisis lenta y espontánea del tioéster interno en la proteína (Pangbum, M.K., y col., *J Exp. Med.* 154: 856-867, 1981). A través de la actividad de  
20 C3 (H<sub>2</sub>O)Bb convertasa, las moléculas de C3b se depositan en la superficie del objetivo iniciando así la vía alternativa.

Antes de este descubrimiento descrito en el presente documento, se sabía muy poco sobre los iniciadores de la activación de la vía alternativa. Se pensó que los activadores incluían paredes celulares de levadura (zimosano), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células tumorales de animales, parásitos y células dañadas. La única característica común de estos activadores es la  
25 presencia de carbohidratos, pero la complejidad y variedad de las estructuras de carbohidratos ha dificultado establecer los determinantes moleculares compartidos que son reconocidos. Se ha aceptado ampliamente que la activación de la vía alternativa se controla a través del equilibrio fino entre componentes reguladores inhibitorios de esta vía, como el factor H, el factor I, DAF y CR1, y properdina, siendo la última la única reguladora positiva de la vía alternativa (ver Schwaeble W.J. y Reid K.B., *Immunol Today* 20 (1): 17 - 21 (1999)).

Además del mecanismo de activación aparentemente no regulado que se ha descrito con anterioridad, la vía alternativa también puede proporcionar un potente bucle de amplificación para la C3 convertasa de la vía de la lectina/clásica (C4b2a), ya que cualquier C3b generado puede participar con el factor B en la formación de la C3 convertasa adicional de la vía alternativa (C3bBb). La C3 convertasa de la vía alternativa se estabiliza mediante la  
35 unión de la properdina. La properdina extiende la semivida de la C3 convertasa de la vía alternativa de seis a diez veces. Añadir C3b a la C3 convertasa de la vía alternativa conduce a la formación de la C5 convertasa de la vía alternativa.

Se ha pensado que las tres vías (es decir, la clásica, la de la lectina y la alternativa) convergen en C5, que se escinde para formar productos con múltiples efectos proinflamatorios. La vía convergente se conoce como vía terminal del complemento. C5a es la anafilatoxina más potente, que induce alteraciones en el músculo liso y el tono vascular, así como la permeabilidad vascular. También es una potente quimiotaxina y un activador de los neutrófilos y monocitos. La activación celular mediada por C5a puede amplificar significativamente las respuestas inflamatorias al inducir la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales, que incluyen citocinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos del ácido araquidónico y especies reactivas de oxígeno. La escisión de C5 conduce a la formación de  
45 C5b-9, también conocido como complejo de ataque a la membrana (MAC). Ahora hay una evidencia contundente de que el depósito subclásica de MAC puede desempeñar un papel importante en la inflamación, además de su papel como un complejo de formación de poros líticos.

Jiang y col., *Journal Exp Med.* Vol. 194 (11): 1609-1616, 2001, describen el inhibidor del complemento 1 de la vía alternativa del complemento. Wong y col., *Mol Immunol* vol 36 (13/14): 853-861, 1999, se refieren a la regulación de serina proteasas asociadas a MBL. Frikis Hareli y col., *Blood* vol 118 (17): 4705 - 4713, 2011; Risitano y col., *Molecular Immunology* vol 47 (13): 2215, 2010; y Holers y colaboradores (documento de patente con el número WO2011/057158) describen el inhibidor de C3/C5 convertasa, TT30, para el tratamiento de enfermedades mediadas por la vía asociada al complemento. Además de su papel esencial en la defensa inmunitaria, el sistema del complemento contribuye al daño tisular en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de desarrollar inhibidores del complemento que sean terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos.

### Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en un sujeto que padece de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). El método incluye la etapa de administrar al

sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3, eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3. En algunos casos, el método comprende, además, administrar al sujeto una composición que comprende un agente inhibidor de la MASP-2.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3, para usar en el tratamiento de un sujeto que padece de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en el que dicho MASP-3 agente inhibidor es un anticuerpo monoclonal de la MASP-3 o un fragmento del mismo que se une específicamente a una porción de la MASP-3 humana (ID. DE SEC. N.º 8).

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para aumentar la supervivencia de los glóbulos rojos en un sujeto que padece de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece HPN, en el que dicho agente inhibidor de la MASP-3 es un anticuerpo monoclonal de la MASP-3 o un fragmento del mismo, que se une específicamente a una porción de la MASP-3 humana (ID. DE SEC. N.º 8).

15 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un agente inhibidor, en la que el agente inhibidor, uno como mínimo, comprende un agente inhibidor de la MASP-2 y un agente inhibidor de la MASP-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la MASP-3 que se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10: de longitud completa) y que también se une a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y un vehículo farmacéutico.

20 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la MASP-3 que se une a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5: de longitud completa) y que también se une a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y un vehículo farmacéutico.

25 La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la MASP-3 que se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10: de longitud completa) y que también se une a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y un vehículo farmacéutico.

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la MASP-3 que se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10 de longitud completa), que se une a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5: longitud completa) y que también se une a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y un vehículo farmacéutico.

30 Tal como se describe en este documento, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención.

La invención aquí descrita resultará evidente con referencia a la siguiente descripción detallada de las figuras.

### Descripción de las figuras

35 La presente invención se apreciará más fácilmente, ya que la misma se entenderá mejor con referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se toma junto con las figuras adjuntas, en las cuales:

La figura 1 ilustra un nuevo concepto de la vía de la lectina y de la vía alternativa;

La figura 2 es un diagrama esquemático adaptado de Schwaeble y col., *Immunobiol* 205: 455-466 (2002), modificado por Yongqing y col., *BBA* 1824: 253 (2012), que ilustra los dominios de las proteínas MASP-2 y MAP19 y el exones que los codifican;

40 La figura 3 es un diagrama esquemático adaptado de Schwaeble y colaboradores, *Immunobiol* 205: 455-466 (2002), modificado por Yongqing y col., *BBA* 1824: 253 (2012), que ilustra los dominios de las proteínas MASP-1, MASP-3 y MAP44 y los exones que los codifican;

La figura 4 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas MASP-1, MASP-2 y MASP-3 e indica regiones de consenso entre ellas;

45 La figura 5 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas alfa de MASP-1, MASP-2 y MASP-3;

La figura 6 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas beta de MASP-1, MASP-2 y MASP-3;

50 La figura 7A muestra una alineación por pares de las secuencias de aminoácidos de los dominios de la proteasa de MASP-1 y MASP-2 (cadenas beta);

La figura 7B muestra una alineación por pares de las secuencias de aminoácidos de los dominios de la proteasa de la MASP-1 y de la MASP-3 (cadenas beta);

La figura 7C muestra una alineación por pares de las secuencias de aminoácidos de los dominios de la proteasa de la MASP-2 y de la MASP-3 (cadenas beta);

5 La figura 8 es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de  $2,6 \times 10^7$  cfu de *N. meningitidis*, serogrupo A Z2491, lo que demuestra que los ratones con deficiencia en MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 1;

10 La figura 9 es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de  $6 \times 10^6$  CFU de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*, lo que demuestra que los ratones con deficiencia en MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 1;

15 La figura 10 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* por ml de sangre recuperada de ratones MASP-2 KO y WT en diferentes momentos, después de infección i.p. con  $6 \times 10^6$  CFU de *N. meningitidis*, serogrupo B, cepa MC58 ( $n = 3$  en diferentes momentos para ambos grupos de ratones), lo que demuestra que aunque los ratones MASP-2 KO estaban infectados con la misma dosis de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* que los ratones WT, los ratones MASP-2 KO denotaron una mejor depuración de la bacteremia, en comparación con los WT, como se describe en el ejemplo 1;

20 La figura 11 ilustra esquemáticamente el puntaje promedio de enfermedad de los ratones MASP-2 KO y WT a las 3, 6, 12 y 24 horas después de haber sido infectados con  $6 \times 10^6$  CFU de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*, lo que demuestra que los ratones con deficiencia en MASP-2 denotaron puntajes mucho más bajos de la enfermedad a las 6 horas, 12 horas y 24 horas después de producida la infección, en comparación con los ratones WT, como se describe en el ejemplo 1;

25 La figura 12 es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de los ratones después de la administración de una dosis infecciosa de  $4 \times 10^6$  CFU de cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*, seguida por la administración 3 horas después de producida la infección de cualquier anticuerpo inhibidor de la MASP-2 (1 mg/kg) o anticuerpo de isotipo de control, lo que demuestra que el anticuerpo de la MASP-2 es eficaz para tratar y mejorar la supervivencia en sujetos infectados con *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 2;

30 La figura 13 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* recuperados en diferentes momentos en las muestras de suero humano, detalladas en la tabla 5, tomadas en diversos momentos después de la incubación con la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*, como se describe en el ejemplo 3;

35 La figura 14 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 del *N. meningitidis* recuperados en diferentes momentos en las muestras de suero humano detalladas en la tabla 7, lo cual indica que la muerte del *N. meningitidis* dependiente del complemento en el suero humano al 20 % (v/v) es dependiente de la MASP-3 y de la MBL, como se describe en el ejemplo 3;

40 La figura 15 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 del *N. meningitidis* recuperado en diferentes momentos en las muestras de suero de ratón detalladas en la tabla 9, lo cual indica que el suero del ratón MASP-2 *-/- knockout* (denominado "MASP-2 *-/-*") tiene un nivel más alto de actividad bactericida para el *N. meningitidis* que el suero de ratón WT, mientras que, en contraste, el suero de ratón MASP-1/3 *-/-* no tiene ninguna actividad bactericida, como se describe en el ejemplo 3;

45 La figura 16 ilustra esquemáticamente la cinética de activación de C3 en condiciones específicas de la vía de la lectina (1 % de plasma) en los sueros de los ratones WT, C4 *-/-*, MASP-1/3 *-/-*, Factor B *-/-* y MASP-2 *-/-*, como se describe en el ejemplo 4;

50 La figura 17 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b motivado por la vía alternativa (impulsado por la AP [*alternative pathway*]) sobre unas placas de microtitulación revestidas con zimosano en condiciones específicas de la vía alternativa (específicas de la AP) "tradicional" (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>), como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de sujetos humanos con deficiencia en MASP-3, con deficiencia en C4 y con deficiencia en MBL, como se describe en el ejemplo 4;

55 La figura 18 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, en condiciones específicas de la AP "tradicional" (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) en función del tiempo, en muestras de suero humano al 10 % obtenidas de sujetos humanos con deficiencia en MASP-3, con deficiencia en C4 y con deficiencia en MBL, como se describe en el ejemplo 4;

La figura 19A ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b en placas de microtitulación recubiertas con manano, como una función de la concentración sérica, en muestras de suero obtenidas de ratones WT, con deficiencia en MASP-2 y con deficiencia en MASP-1/3, en condiciones específicas de la AP “tradicional” (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como de la vía alternativa (AP) (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), como se describe en el ejemplo 4;

La figura 19B ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de ratones WT, con deficiencia en MASP-2 y con deficiencia en MASP-1/3, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas tales que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como la vía alternativa (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), como se describe en el ejemplo 4;

La figura 19C ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b sobre placas de microtitulación revestidas con *S. pneumoniae* D39, como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de ratones WT, con deficiencia en MASP-2 y con deficiencia en MASP-1/3, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como de la vía alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), como se describe en el ejemplo 4;

La figura 20A ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b en sueros altamente diluidos, que se llevó a cabo en placas de microtitulación recubiertas con manano en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas tales que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como de la vía alternativa (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas variables entre el 0 % y el 1,25 %, como se describe en el ejemplo 4;

La figura 20B ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en placas de microtitulación revestidas con zimosano, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas tales que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como de la vía alternativa (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas variables entre el 0 % y el 1,25 %, como se describe en el ejemplo 4;

La figura 20C ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en placas de microtitulación recubiertas con *S. pneumoniae* D39, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas tales que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la lectina como de la vía alternativa (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas variables entre el 0 % y el 1,25 %, como se describe en el ejemplo 4;

La figura 21 ilustra esquemáticamente el nivel de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3 -/-) hacia el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano mediante suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca<sup>++</sup>), en un intervalo de diluciones séricas en el suero de MASP-3 -/-, en el suero humano normal inactivado por calor (HI NHS, *heat inactivated normal human serum*), MBL -/-, NHS + el anticuerpo monoclonal de MASP-2 y el control de NHS, como se describe en el ejemplo 5;

La figura 22 ilustra esquemáticamente el nivel de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3 -/-) hacia el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano mediante suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca<sup>++</sup>) en un intervalo de concentración sérica en el suero de MASP-3 -/-, NHS inactivado por calor (HI), MBL -/-, NHS + anticuerpo monoclonal de la MASP-2 y control de NHS, como se describe en el ejemplo 5;

La figura 23 ilustra esquemáticamente el nivel de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos de ratón WT lisados hacia el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos, mediante suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca<sup>++</sup>), en un intervalo de concentraciones séricas en suero de 3MC (MASP-3 -/-), NHS inactivado por calor (HI), MBL -/-, NHS + anticuerpo monoclonal de la MASP-2 y control de NHS, como se describe en el ejemplo 5;

La figura 24 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos de ratón lisados (CD55/59 -/-) hacia el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos mediante suero humano, en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca<sup>++</sup>), en un intervalo de concentraciones séricas en el suero de NHS inactivado por calor (HI), MBL -/-, NHS + anticuerpo monoclonal de MASP-2 y control de NHS, como se describe en el ejemplo 5;

La figura 25 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados hacia el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con de manano, por el suero de ratón MASP-1/3 -/- y el suero de ratón control WT, en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca<sup>++</sup>), en un intervalo de concentraciones séricas, como se describe en el ejemplo 6;

- La figura 26 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano, como una función de la concentración sérica en muestras de suero del factor D *-/-*, muestras de suero de ratones MASP-2 *-/-* y WT, en un ensayo de depósito de C3, llevado a cabo en condiciones específicas de AP, como se describe en el ejemplo 7;
- 5 La figura 27 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano como una función de la concentración sérica en muestras de suero del factor D *-/-*; sueros de ratón MASP-2 *-/-* y de WT, en un ensayo de depósito de C3 llevado a cabo en condiciones fisiológicas (en presencia de Ca<sup>++</sup>), como se describe en el ejemplo 7;
- 10 La figura 28 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano, como una función del tiempo de incubación del suero (minutos) en muestras de suero de ratón obtenidas del factor D *-/-*; factor B *-/-*; más y menos el anticuerpo monoclonal de MASP-2, en un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en condiciones fisiológicas (en presencia de Ca<sup>++</sup>), como se describe en el ejemplo 7;
- 15 La figura 29A ilustra esquemáticamente el depósito de C4b específico de la vía de la lectina sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano, medida *ex vivo* en muestras de suero no diluido tomadas de ratones (n = 3 ratones/grupo) en diversos momentos después de la dosificación subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb de MASP-2 de ratón, como se describe en el ejemplo 13;
- 20 La figura 29B ilustra esquemáticamente el transcurso del tiempo de la recuperación de la vía de la lectina durante tres semanas, después de una administración intraperitoneal única de MoAb de MASP-2 de ratón, en 0,6 mg/kg en ratones, como se describe en el ejemplo 13;
- La figura 30A es un histograma de FACS de unión de antígeno/anticuerpo de la MASP-3 para el clon M3J5, como se describe en el ejemplo 15;
- La figura 30B es un histograma de FACS de unión de antígeno/anticuerpo de la MASP-3 para el clon M3M1, como se describe en el ejemplo 15;
- 25 La figura 31 ilustra esquemáticamente una curva de unión de saturación del clon M3J5 (clon 5) para el antígeno de MASP-3, como se describe en el ejemplo 15;
- La figura 32A es una alineación de secuencias de aminoácidos de las regiones VH de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia de DT40 VH de pollo, en donde los puntos representan la identidad de los aminoácidos con la secuencia de DT40 y los guiones indican espacios introducidos para maximizar la alineación, como se describe en el ejemplo 15;
- 30 La figura 32B es una alineación de secuencia de aminoácidos de las regiones VL de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia DT40 VL de pollo, en la que los puntos representan la identidad de aminoácidos con la secuencia DT40 y los guiones indican espacios introducidos para maximizar la alineación, como se describe en el ejemplo 15;
- 35 La figura 33 es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibidora del mAb1E10 en la pantalla del sistema de complemento Wieslab, MBL Pathway, en comparación con el suero positivo proporcionado con el kit de ensayo, así como un anticuerpo de control isotópico, lo que demuestra que mAb1E10 inhibe parcialmente la activación dependiente de LEA-2, (a través de la inhibición de la activación de MASP-2 dependiente de la MASP-1), mientras que el anticuerpo de control isotópico no lo hace, como se describe en el ejemplo 15;
- 40 La figura 34 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b para el suero humano normal al 1 % más control isotópico, SGMI-1Fc o SGMI-2Fc, en un intervalo de concentraciones variable de 0,15 a 1000 nM, lo que demuestra que tanto SGMI-1Fc como SGMI-2Fc inhibieron el depósito de C3b desde el suero normal en los pocillos de ELISA revestidos con manano, con valores de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 27 nM y 300 nM, respectivamente, como se describe en el ejemplo 16;
- 45 La figura 35A proporciona los resultados del análisis de citometría de flujo para el depósito de C3b sobre el *Staphylococcus aureus* muerto por calor, lo que demuestra que en el suero humano normal, en presencia de EDTA, que se sabe que inactiva la vía de la lectina y la vía alternativa, no se observó depósito de C3b (panel 1); en el suero humano normal tratado con Mg<sup>++</sup>/EGTA, se observó depósito de C3b inducido por la vía alternativa (panel 2), y como se muestra en los paneles 3, 4 y 5, en el suero sin factor B, sin factor D y sin properdina (factor P), respectivamente, no se observó depósito de C3b inducido por la vía alternativa, como se describe en el ejemplo 17;
- 50 La figura 35B proporciona los resultados del análisis de citometría de flujo para el depósito de C3b sobre el *S. aureus* muerto por calor, lo que demuestra que, al igual que en el suero normal tratado con EDTA (panel 1), el depósito de C3b impulsado por la AP está ausente en el suero de 3MC, en presencia de Mg<sup>++</sup>/EGTA (panel 3), mientras que los paneles 4 y 5 muestran que tanto el rMASP-3 activo de longitud completa (panel 4) como el rMASP-3 activo (CCP1-CCP2-SP) (panel 5) restauran el depósito de C3b impulsado por la AP en el suero de un

paciente con 3MC a los niveles observados en el suero normal tratado con  $Mg^{++}/EGTA$  (panel 2), y que ni el rMASP-3 inactivo (S679A) (panel 6) ni el rMASP-1 de tipo salvaje (panel 7) pueden restaurar el depósito de C3b impulsado por la AP en el suero de un paciente con 3MC, como se describe en el ejemplo 17;

5 La figura 36 muestra los resultados de un análisis de transferencia *Western* [*Western Blot*] para determinar la escisión del factor B, en respuesta al *S. aureus* en el suero de un paciente con 3MC, en presencia o ausencia de rMASP-3, lo que demuestra que el suero humano normal, en presencia de EDTA (control negativo, banda 1), denota muy poca escisión del factor B en relación con el suero humano normal, en presencia de  $Mg^{++}/EGTA$ , que se muestra en la franja 2 (control positivo), como se muestra además en la franja 3; el suero de un paciente con 3MC muestra muy poca escisión del factor B en presencia de  $Mg^{++}/EGTA$ . Sin embargo, como se muestra en la franja 4, la escisión del factor B se restablece mediante la adición y preincubación de la proteína de MASP-3 recombinante de longitud completa al suero de 3MC, como se describe en el ejemplo 17;

15 La figura 37 muestra la tinción de Comassie de un gel proteico en el que se analiza la escisión del factor B, lo que demuestra que la escisión del factor B es más óptima en presencia de C3, MASP-3 y pro-factor D (banda 1), y como se muestra en las bandas 4 y 5, ya sea MASP-3 o el pro factor D solos pueden mediar la escisión del factor B, siempre que esté presente C3, como se describe en el ejemplo 17;

20 La figura 38 ilustra esquemáticamente las intensidades fluorescentes medias (MFI, *mean fluorescent intensities*) de la tinción con C3b del *S. aureus* obtenidas del mAbD14 (que se une a MASP-3), del mAb1A5 (anticuerpo de control negativo) y de un anticuerpo de control de isotipo representado como una función de la concentración del mAb en el suero de 3MC, en presencia de rMASP-3, lo que demuestra que el mAbD14 inhibe el depósito de C3b dependiente de la MASP-3 de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el ejemplo 17;

25 La figura 39 muestra el análisis de transferencia *Western* de la escisión del sustrato pro-factor D, en comparación con el pro-factor D solo banda 1) o el MASP-3 recombinante inactivo de longitud completa (S679A; banda 3) o MASP-1 (S646A; banda 4), MASP-3 recombinante del tipo natural, de longitud completa (banda 2) y MASP-1 (banda 5) escinden ya sea parcial o completamente el pro-factor D para generar el factor D maduro, como se describe en el ejemplo 18;

30 La figura 40 es una transferencia *Western* que muestra la actividad inhibidora de los mAb D14 de unión a MASP-3 (banda 2) y M3M1 (banda 3) en la escisión del pro-factor D dependiente de la MASP-3, en comparación con una reacción de control que contiene solo MASP-3 y pro-factor D (sin mAb, banda 1), así como una reacción de control que contiene un mAb obtenido de la biblioteca DTLacO que se une a MASP-1, pero no a MASP-3 (banda 4), como se describe en el ejemplo 18;

35 La figura 41 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de sujetos con deficiencia de MASP-3 (3MC), con deficiencia de C4 y con deficiencia en MBL, lo que demuestra que los sueros con deficiencia en MASP-3 del paciente 2 y del paciente 3 tienen actividad residual de AP a altas concentraciones séricas (concentraciones séricas de 25 %, 12,5 %, 6.25 %), pero una  $AP_{50}$  (es decir, 8,2 % y 12,3 % del suero necesario para alcanzar el 50 % del depósito máximo de C3) significativamente mayor, como se describe en el ejemplo 19;

40 La figura 42 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano en condiciones de la AP "tradicional" (es decir,  $BBS/EGTA/Mg^{++}$  sin  $Ca^{++}$ ) en función del tiempo, en muestras de suero humano al 10 % obtenidas de sujetos humanos con deficiencia de MASP-3, con deficiencia de C4 y con deficiencia en MBL, como se describe en el ejemplo 19;

45 La figura 43 ilustra esquemáticamente el porcentaje de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados hacia el sobrenadante, medido por fotometría) desde eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un intervalo de concentraciones séricas, en el suero de dos sujetos humanos normales (NHS) y de dos pacientes 3MC (el paciente 2 y el paciente 3), medición que se practicó en ausencia de  $Ca^{++}$ , lo cual demuestra que la deficiencia de MASP-3 reduce el porcentaje de lisis mediada por el complemento de los eritrocitos recubiertos con manano, en comparación con suero humano normal, como se describe en el ejemplo 19;

50 La figura 44 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como una función de la concentración de proteína de MASP-3 recombinante de longitud completa, añadida a las muestras de suero obtenidas del paciente humano 2 con 3MC (MASP-3<sup>-/-</sup>), lo que demuestra que, en comparación con el MASP-3 recombinante inactivo de control negativo (MASP-3A; S679A), la proteína MASP-3 recombinante activa reconstituye el depósito de C3b impulsado por la AP sobre las placas recubiertas con zimosano de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el ejemplo 19;

55 La figura 45 ilustra esquemáticamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina desde eritrocitos de conejo lisados hacia el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un intervalo de concentraciones séricas en: (1) suero humano normal (NHS); (2) suero de un paciente

- 5 con 3MC; (3) suero de un paciente con 3MC más MASP-3 recombinante activa de longitud completa (20 µg/ml) y (4) suero humano inactivado por calor (HIS), medido en ausencia de Ca<sup>++</sup>, lo que demuestra que el porcentaje de lisis de los eritrocitos de conejo aumenta significativamente en el suero de un paciente con 3MC que contiene rMASP-3, en comparación con el porcentaje de lisis en el suero de un paciente con 3MC sin MASP-3 recombinante (p = 0,0006), como se describe en el ejemplo 19;
- 10 La figura 46 ilustra esquemáticamente el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo en suero humano al 7 % del paciente 2 con 3MC y del paciente 3 con 3MC que contiene MASP-3 recombinante activo en un intervalo de concentración de 0 a 110 µg/ml (en BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA, lo cual demuestra que el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo aumenta con la cantidad de MASP-3 recombinante de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el ejemplo 19 y
- La figura 47 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por el LEA-2 sobre placas ELISA recubiertas con manano, como una función de la concentración del suero humano diluido en tampón BBS, para suero de un sujeto humano normal (NHS), de dos pacientes 3MC (el paciente 2 y el paciente 3), de los padres del paciente 3 y de un sujeto con deficiencia en MBL.
- 15 **Descripción de la lista de secuencias**
- ID. DE SEC. N.º 1: ADNc de la MAp19 humana
- ID. DE SEC. N.º 2: proteína de la MAp19 humana (con el líder)
- ID. DE SEC. N.º 3: proteína de la MAp19 humana (madura)
- ID. DE SEC. N.º 4: ADNc de la MASP-2 humana
- 20 ID. DE SEC. N.º 5: proteína de la MASP-2 humana (con líder)
- ID. DE SEC. N.º 6: proteína de la MASP-2 humana (madura)
- ID. DE SEC. N.º 7: ADNc de la MASP-3 humana
- ID. DE SEC. N.º 8: proteína de la MASP-3 humana (con líder)
- ID. DE SEC. N.º 9: ADNc de la MASP-1 humana
- 25 ID. DE SEC. N.º 10: proteína de la MASP-1 humana (con líder)
- ID. DE SEC. N.º 11: proteína de la MAp44 humana (con líder)
- ID. DE SEC. N.º 12: ADNc de la MASP-2 de rata
- ID. DE SEC. N.º 13: proteína de la MASP-2 de rata (con líder)
- 30 ID. DE SEC. N.º 14: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada (VH) de 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646) (sin péptido de señal)
- ID. DE SEC. N.º 15: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) de 17D20\_dc35VH21N11VL (OMS646)
- ID. DE SEC. N.º 16: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) de 17N16mc
- ID. DE SEC. N.º 17: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) de 17D20\_dc21N11VL (OMS644)
- 35 SEC ID N.º 18: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera (VL) de 17N16\_dc17N9 (OMS641) (sin péptido de señal)
- SEC ID N.º 19: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) de 17N16\_dc17N9 (OMS641)
- SEC ID N.º 20: polipéptido de longitud completa del clon 17N16m\_d17N9 de scFv, hija
- SEC ID N.º 21: polipéptido de longitud completa del clon 17D20m\_d352N11 de scFv, hija
- 40 SEC ID N.º 22: ADN del clon 17N16m\_d17N9 de scFv, hija que codifica el polipéptido de longitud completa (sin péptido de señal)
- SEC ID N.º 23: ADN del clon 17D20m\_d352N11 de scFv, hija que codifica el polipéptido de longitud completa (sin péptido de señal)

- ID. DE SEC. N.º 24: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) de DTLacO parental
- ID. DE SEC. N.º 25: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon M3J5 específico de la MASP-3
- ID. DE SEC. N.º 26: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) M3M1 específico de la MASP-3
- 5 ID. DE SEC. N.º 27: polipéptido de la región variable (VL) de la cadena ligera de DTLacO parental
- ID. DE SEC. N.º 28: polipéptido de la región variable de la cadena ligera M3J5 (VL) específico de la MASP-3
- ID. DE SEC. N.º 29: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) del clon M3M1 específico de la MASP-3
- ID. DE SEC. N.º 30: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon D14 de la MASP-3
- 10 ID. DE SEC. N.º 31: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VL) del clon D14 de la MASP-3
- ID. DE SEC. N.º 32: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon 1E10 de la MASP-1
- ID. DE SEC. N.º 33: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) del clon 1E10 de la MASP-1
- ID. DE SEC. N.º 34: péptido de SGMI-1
- ID. DE SEC. N.º 35: péptido SGMI-2
- 15 ID. DE SEC. N.º 36: polipéptido de la IgG1-Fc humana
- ID. DE SEC. N.º 37: enlazador número 1 del péptido (12aa)
- ID. DE SEC. N.º 38: enlazador número 2 del péptido (10aa);
- ID. DE SEC. N.º 39: ácido nucleico que codifica la fusión de polipéptido que comprende la secuencia de señal de IL-2 humana, SGMI-1, el enlazador número 1 y la IgG1-Fc humana;
- 20 ID. DE SEC. N.º 40: fusión del polipéptido maduro que comprende SGMI-1, el enlazador número 1 y la IgG1-Fc humana (SGMI-1Fc);
- ID. DE SEC. N.º 41: ácido nucleico que codifica la fusión de polipéptido que comprende la secuencia de señal de IL-2 humana, SGMI-2, el enlazador número 1 y la IgG1-Fc humana;
- ID. DE SEC. N.º 42: fusión de polipéptido maduro que comprende SGMI-2, el enlazador número 1 y la IgG1-Fc humana (SGMI-2Fc).
- 25

### Descripción detallada

#### I. Definiciones

A menos que se defina específicamente en este documento, todos los términos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entenderían los expertos en la técnica de la presente invención. Las siguientes definiciones se proporcionan con el fin de proporcionar claridad con respecto a los términos tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones para describir esta invención.

30

Tal como se usa en este documento, el brazo efector 1 de la vía de la lectina ("LEA-1") se refiere a la activación dependiente de la lectina del factor B y del factor D mediante la MASP-3.

Tal como se usa en este documento, el brazo efector 2 de la vía de la lectina ("LEA-2") se refiere a la activación del complemento dependiente de la MASP-2.

35

Como se usa en el presente documento, la frase "activación del complemento dependiente de la MASP-3" comprende dos componentes: (i) la activación dependiente de la MASP-3 de la lectina del factor B y del factor D, incluida en la activación del complemento mediada por LEA-1, ocurre en presencia de  $Ca^{++}$ , que comúnmente conduce a la conversión de C3bB en C3bBb y del pro-factor D en factor D; y (ii) la conversión independiente de la lectina del factor B y del factor D, que puede ocurrir en ausencia de  $Ca^{++}$ , lo que conduce comúnmente a la conversión de C3bB en C3bBb y del pro-factor D en el factor D. Se ha determinado que la activación del complemento mediada por LEA-1 y la conversión independiente de la lectina del factor B y del factor D causan opsonización y/o lisis. Lejos de aceptar las limitaciones de ninguna teoría en particular, se cree que solo cuando se asocian y unen muchas moléculas de C3b en estrecha proximidad, la C3bBb C3 convertasa cambia su especificidad de sustrato y escinde C5 como la C5 convertasa de la vía alternativa, denominada C3bBb(C3b)n.

40

45

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “activación del complemento dependiente de la MASP-2”, también denominada en el presente documento activación del complemento mediada por LEA-2, comprende la activación dependiente de la lectina de la MASP-2, que se produce en presencia de  $Ca^{++}$ , lo cual conduce a la formación de la C3 convertasa C4b2a de la vía de la lectina y, tras la acumulación del producto de escisión de C3, C3b, posteriormente a la formación de la C5 convertasa, C4b2a(C3b)<sub>n</sub> que, según se ha determinado, causa opsonización y/o lisis.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “concepto tradicional de la vía alternativa”, que también se conoce como “vía alternativa tradicional”, se refiere a la vía alternativa anterior al descubrimiento de esta invención descrita en el presente documento, es decir, que la activación del complemento se desencadena, por ejemplo, por el zimosano desde las paredes de las células fúngicas y de levadura, por los lipopolisacáridos (LPS) de las membranas externas Gram negativas y los eritrocitos de conejo, así como a partir de muchos polisacáridos puros, virus, bacterias, células tumorales de animales, parásitos y células dañadas, y que tradicionalmente se ha pensado que surgen de la generación proteolítica espontánea de C3b, a partir del factor C3 del complemento. Según se utiliza en el presente documento, la activación de la “vía alternativa tradicional”, también denominada en la presente memoria descriptiva la “vía alternativa”, se mide en tampón  $Mg^{++}$ /EGTA (es decir, en ausencia de  $Ca^{++}$ ).

Como se usa en el presente documento, la frase “vía de la lectina” se refiere a la activación del complemento que se produce a través de la unión específica de proteínas de unión a carbohidratos séricas y no séricas, incluso la lectina de unión al manano (MBL, *mannan-binding lectin*), CL-11 y las ficolinas (H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina). Como se describe aquí, los inventores han descubierto que la vía de la lectina es impulsada por los dos brazos efectores, el brazo efector 1 de la vía de la lectina (LEA-1), que ahora se sabe que es dependiente de la MASP-3, y el brazo efector 2 de la vía de la lectina (LEA-2), que depende de la MASP-2. Conforme se emplea en este documento, la activación de las vías de lectina se evalúa utilizando tampones que contienen  $Ca^{++}$ .

Tal como se usa en este documento, la expresión “vía clásica” se refiere a la activación del complemento que se desencadena por un anticuerpo unido a una partícula extraña y que requiere la unión de la molécula de reconocimiento C1q.

Como se usa en el presente documento, el término “HTRA-1” se refiere a la serina peptidasa denominada serina-proteasa A1 que requiere altas temperaturas.

Como se usa en el presente documento, la frase “agente inhibidor de la MASP-3” se refiere a cualquier agente que directa o indirectamente inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-3, incluidos los agentes que se unen a la MASP-3 o interactúan directamente con ella, lo cual abarca los anticuerpos de la MASP-3 y los fragmentos de los mismos de unión a la MASP-3, los péptidos naturales y sintéticos, los sustratos competitivos, las moléculas pequeñas, los inhibidores de la expresión y los inhibidores naturales aislados, y también comprende los péptidos que compiten con la MASP-3 por la unión a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, CL-11, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de la lectina. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es específico de la MASP-3 y no se une a la MASP-1 ni a la MASP-2. Un agente inhibidor que inhibe directamente a la MASP-3 se puede denominar agente inhibidor directo de la MASP-3 (por ejemplo, un anticuerpo de la MASP-3), mientras que un agente inhibidor que inhibe indirectamente a la MASP-3 se puede denominar agente inhibidor indirecto de la MASP-3 (por ejemplo, un anticuerpo de la MASP-1 que inhibe la activación de la MASP-3). Un ejemplo de inhibidor directo de la MASP-3 es el agente es el agente inhibidor específico de la MASP-3, tal como un agente inhibidor de la MASP-3 que se une específicamente a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema de complemento. En un caso, un agente inhibidor de la MASP-3 inhibe indirectamente la actividad de la MASP-3, como, por ejemplo, un inhibidor de la activación de la MASP-3, que incluye un inhibidor de la activación de la MASP-3 mediada por MASP-1 (por ejemplo, un anticuerpo de la MASP-1 o fragmentos de los mismos de unión a la MASP-1, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, inhibidores de la expresión e inhibidores naturales aislados, y también abarca péptidos que compiten con MASP-1 por la unión a MASP-3). En otro caso, un agente inhibidor de la MASP-3 inhibe la maduración mediada por MASP-3 del factor D. En otro caso, un agente inhibidor de la MASP-3 inhibe la activación mediada por MASP-3 del factor B. Los agentes inhibidores de la MASP-3 útiles en el método de la invención pueden reducir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en más del 10 %, como por ejemplo, en más del 20 %, en más del 50 % o en más del 90 %. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 reduce la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en más del 90 % (es decir, obteniéndose como resultado una activación del complemento MASP-3 de solo el 10 % o menos). Se espera que la inhibición de la MASP-3 bloquee, en su totalidad o en parte, tanto la lisis y la opsonización relacionada con LEA-1 como la conversión independiente de la lectina del factor B y la lisis y opsonización relacionadas con el factor D.

Tal como se usa en este documento, la frase “agente inhibidor de la MASP-1” se refiere a cualquier agente que se une a la MASP-1 o interactúa directamente con ella e inhibe al menos uno de lo siguiente: (i) la activación de complemento dependiente de la MASP-3 y/o (ii) las activación del complemento dependiente de la MASP 2 y/o (iii) la maduración del factor D mediada por la MASP-1 independiente de la lectina o dependiente de la lectina, donde la maduración del factor D mediada por la MASP-1 dependiente de la lectina implica la activación directa del factor D, incluidos los anticuerpos de la MASP-1 y los fragmentos de unión de MASP-1 de los mismos, péptidos naturales y

5 sintéticos, moléculas pequeñas, inhibidores de la expresión e inhibidores naturales aislados, y también abarca péptidos que compiten con la MASP-1 por la unión a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, CL-11, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de la lectina. Los agentes inhibidores de la MASP-1 útiles en el método de la invención reducen la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en más del 10 %, por ejemplo, en más del 20 %, en más del 50 % o en más del 90 %. El agente inhibidor de la MASP-1 reduce la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en más del 90 % (es decir, obteniéndose como resultado una activación del complemento MASP-3 de solo el 10 % o menos). En otro caso, los agentes inhibidores de la MASP-1 útiles en el método de la invención reducen la activación del complemento dependiente de la MASP-2 en más del 10 %, por ejemplo, en más del 20 %, en más del 50 % o en más del 90 %. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-1 reduce la activación del complemento dependiente de la MASP-2 en más del 90 % (es decir, obteniéndose como resultado una activación del complemento MASP-2 de solo el 10 % o menos).

15 Los agentes inhibidores de la MASP-1 útiles en el método de la invención reducen la activación del complemento dependiente de la MASP-3 (LEA-1), la conversión independiente de la lectina del factor B y del factor D y la activación del complemento dependiente de la MASP-2 (LEA-2) en más del 10 %, por ejemplo, en más del 20 %, en más del 50 % o en más del 90 %. El agente inhibidor de la MASP-1 reduce la activación del complemento dependiente de la MASP-3 (LEA-1), la conversión independiente de la lectina del factor B y del factor D y la activación del complemento dependiente de la MASP-2 (LEA-2) en más del 90 % (es decir, obteniéndose como resultado una activación del complemento por MASP-3 de solo el 10 % o menos y una activación del complemento por MASP-2 de solo el 10 % o menos).

20 Un ejemplo de un agente inhibidor directo de la MASP-1 es un agente inhibidor específico de la MASP-1, tal como un agente inhibidor de la MASP-1 que se une específicamente a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento. En muchos casos, dado que la MASP-1 puede activar a la MASP-3, y dado que la MASP-1 puede activar a la MASP-2, sería de esperar que la inhibición de la MASP-1 fuera eficaz para inhibir ya sea a la MASP-3 y/o a la MASP-2. En algunos casos, sin embargo, la inhibición de la MASP-1 o MASP-3 o MASP-2 puede ser un caso preferido con relación a la inhibición de los otros objetivos de la MASP. Por ejemplo, en el contexto de la infección por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), se ha demostrado que la MASP-3 se activa y que es la responsable de la opsonización del *S. aureus* en ausencia de la MASP-1 (véase Iwaki D. y colaboradores, *J Immunol* 187 (7): 3751- 8 (2011)). Por lo tanto, en el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), por ejemplo, podría ser ventajoso inhibir directamente a la MASP-1, en lugar de a la MASP-3, reduciendo así la susceptibilidad potencial al *S. aureus* durante el tratamiento inhibitorio de la HPN con LEA-1.

35 Como se usa en el presente documento, la frase “agente inhibidor de la MASP-2” se refiere a cualquier agente que se une a la MASP-2 o interactúa directamente con ella e inhibe al menos uno de lo siguiente: (i) la activación de complemento dependiente de la MASP-2 y/o (ii) la activación del complemento dependiente de la MASP-1, lo cual incluye anticuerpos de la MASP-2 y fragmentos de los mismos de unión a la MASP-2, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, inhibidores de la expresión e inhibidores naturales aislados, y también abarca péptidos que compiten con la MASP-2 por unirse a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, CL-11, H-ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de la lectina. Los agentes inhibidores de la MASP-2 útiles en el método de la invención pueden reducir la activación del complemento dependiente de la MASP-2 en más del 10 %, tal como por ejemplo, en más del 20 %, en más del 50 % o en más del 90 %. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-2 reduce la activación del complemento dependiente de la MASP-2 en más del 90 % (es decir, obteniéndose como resultado una activación del complemento por MASP-2 de solo el 10 % o menos). Un ejemplo de un agente inhibidor directo de la MASP-2 es un agente inhibidor específico de la MASP-2, tal como un agente inhibidor de la MASP-2 que se une específicamente a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento.

50 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de los mismos, derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (por ejemplo, ratón, rata, conejo y primate, incluido el ser humano) o de un hibridoma, de la selección de fagos, de la expresión recombinante o de animales transgénicos (u otros métodos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos), que se unen específicamente a un polipéptido diana, tal como por ejemplo, los polipéptidos de la MASP-1, de la MASP-2 o de la MASP-3 o porciones de los mismos. No es la intención limitar el término “anticuerpo” con respecto a su origen o a la manera en la que se lo prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animal transgénico, síntesis de péptidos, etc.). Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos pan-específicos, multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos monoclonales quiméricos, de ratón-humano, ratón-primate, anticuerpos monoclonales de primate-humano; y anticuerpos anti-idiotipo, y puede tratarse de cualquier anticuerpo intacto o fragmento del mismo. Conforme se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), cadenas simples (ScFv), sus variantes sintéticas, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una porción del anticuerpo con un fragmento de unión al antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio o fragmento de unión al

antígeno (sitio de reconocimiento de epítomos) de la especificidad requerida.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos, en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto por aminoácidos (de origen natural y de origen no natural), que participan en la unión selectiva de un epítomo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos para el antígeno diana. El término "anticuerpo monoclonal" abarca no solo los anticuerpos monoclonales intactos y a los anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también a los fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), de cadena simple (ScFv), las variantes de los mismos, las proteínas de fusión que comprenden una porción de unión al antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión al antígeno (sitio de reconocimiento de epítomos) de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un epítomo. No se pretende limitarlos con respecto al origen del anticuerpo o a la manera en la que se los prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos, etc. descritos anteriormente bajo la definición de "anticuerpo".

Tal como se usa en este documento, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción derivada de un anticuerpo de longitud completa o relacionada con él, tal como, por ejemplo, un anticuerpo de MASP-1, MASP-2 o MASP-3, que generalmente incluye la unión al antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, los fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende, además, un enlazador polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, lo cual permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

Tal como se usa en este documento, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad, que derivan de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, de un roedor), mientras que el resto de la molécula del anticuerpo deriva de un anticuerpo humano.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que se ajusta a las regiones específicas determinantes de la complementariedad, derivadas de inmunoglobulina no humana que se trasplanta en un marco de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son típicamente proteínas recombinantes en las que solo las regiones determinantes de la complementariedad de los anticuerpos son de origen no humano (incluidos los anticuerpos generados a partir de la presentación de fagos o de la levadura).

Como se usa en el presente documento, la frase "lectina de unión a manano" ("MBL", *lectin-binding protein*) es equivalente a la proteína de unión a manano ("MBP", *mannan-binding protein*).

Tal como se usa en el presente documento, el "complejo de ataque a la membrana" ("MAC", *membrane attack complex*) se refiere a un complejo de los cinco componentes terminales del complemento (C5b combinado con C6, C7, C8 y C9) que se insertan en las membranas y las afecta (también denominado C5b-9).

Según se emplea en el presente documento, "un sujeto" incluye a todos los mamíferos, término que abarca, sin limitación humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores.

Tal como se utiliza en este documento, los residuos de aminoácidos se abrevian de la siguiente manera: alanina (Ala; A), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), arginina (Arg; R), cisteína (Cys; C), ácido glutámico (Glu; E), glutamina (Gln; Q), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V).

En el sentido más amplio, los aminoácidos naturales pueden dividirse en grupos, en función de la característica química de la cadena lateral de los respectivos aminoácidos. Por aminoácido "hidrófobo" se entiende Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por aminoácido "hidrófilo" se entiende Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg o His. Esta agrupación de aminoácidos puede subclasificarse de la siguiente manera. Por aminoácido "hidrófilo no cargado" se entiende Ser, Thr, Asn o Gln. Por aminoácido "ácido" se entiende Glu o Asp. Por aminoácido "básico" se entiende Lys, Arg o His.

Como se usa en el presente documento, la frase "sustitución conservadora de aminoácidos" se ilustra mediante una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina y (6) lisina, arginina e histidina.

El término “oligonucleótido”, conforme se emplea en el presente documento, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término también cubre aquellas oligonucleobases compuestas por nucleótidos, azúcares y enlaces internucleósidos covalentes (estructura principal) de origen natural, así como también, los oligonucleótidos que tienen modificaciones que no se producen de forma natural.

Tal como se usa en este documento, un “epítipo” se refiere al sitio en una proteína (por ejemplo, una proteína de la MASP-3 humana), que está unido por un anticuerpo. Los “epítipos solapantes” incluyen al menos un residuo de aminoácidos común (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis), que incluyen epítipos lineales y no lineales.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a un péptido, independientemente de su longitud o modificación postraducción. Las proteínas de la MASP (MASP-1, MASP-2 o MASP-3) descritas en este documento pueden contener proteínas de tipo salvaje o ser propiamente proteínas de tipo salvaje o pueden ser variantes que no tienen más de 50 (por ejemplo, no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50) sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

La proteína MASP-1 humana (expresada como ID. DE SEC. N.º 10), la proteína MASP-2 humana (expresada como ID. DE SEC. N.º 5) y la proteína MASP-3 humana (expresada como ID. DE SEC. N.º 8) descritas aquí también incluyen “fragmentos de péptidos” de las proteínas, que son más cortos que las proteínas de la MASP de longitud completa y/o inmaduras (pre-pro), que incluyen fragmentos peptídicos de una proteína de MASP que incluyen variantes de eliminación tanto terminales como internas de la proteína. Las variantes de eliminación pueden carecer de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 segmentos de aminoácidos (de dos o más aminoácidos) o aminoácidos únicos no contiguos. La proteína MASP-1 humana puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica en cuanto a su secuencia en un 70 % (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %) o más respecto de la proteína de MASP-1 humana, que tiene la secuencia de aminoácidos expresada en la ID. DE SEC. N.º 10.

La proteína de la MASP-3 humana puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica en cuanto a su secuencia en un 70 % (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %) o más respecto de la proteína de la MASP-3 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expresada en la ID. DE SEC. N.º 8.

En algunos casos, la proteína de la MASP-2 humana puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica en cuanto a su secuencia en un 70 % (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %) o más respecto de la proteína de la MASP-2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expresada en la ID. DE SEC. N.º 5

En algunos casos, los fragmentos peptídicos pueden estar constituidos por al menos 6 (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 600 o más) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 6 residuos de aminoácidos contiguos en cualquiera de las ID. DE SEC. NROS. 5, 8 o 10). En algunos casos, un fragmento de péptido antigénico de una proteína de la MASP humana puede estar constituido por menos de 500 (por ejemplo, por menos de 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, menos de 500 residuos de aminoácidos contiguos en cualquiera de las ID DE SEC. NROS. 5, 8 o 10).

En algunos casos, en el contexto de generar un anticuerpo que se una a la MASP-1, a la MASP-2 y/o a la MASP-3, los fragmentos peptídicos son antigénicos y retienen al menos 10 % (por ejemplo, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, al menos el 99,5 % o el 100 % o más) de la capacidad de la proteína de longitud completa para inducir una respuesta antigénica en un mamífero (ver más adelante, bajo “Métodos para producir un anticuerpo”).

El porcentaje (%) de identidad de secuencia de los aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un *software* informático públicamente

disponible como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando, se pueden determinar mediante métodos conocidos.

5 La proteína de la MASP-1 humana (ID. DE SEC. N.º 10) está codificada por la secuencia de ADNc indicada como ID. DE SEC. N.º 9; la proteína de la MASP-2 humana (ID. DE SEC. N.º 5) está codificada por la secuencia de ADNc expresada como ID. DE SEC. N.º 4; y la proteína de la MASP-3 humana (ID. DE SEC. N.º 8) está codificada por la secuencia de ADNc expresada como ID. DE SEC. N.º 7. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias de ADNc descritas en la ID. DE SEC. N.º 9, la ID. DE SEC. N.º 4 y la ID. DE SEC. N.º 7 representan un solo alelo de las MASP-1, MASP-2 y MASP-3 humanas, respectivamente, y está previsto que haya variación alélica y empalme alternativo. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos mostradas en la ID. DE SEC. N.º 9, la ID. DE SEC. N.º 4 y la ID. DE SEC. N.º 7, que incluyen aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención. Las variantes alélicas de la secuencia de las MASP-1, MASP-2 o MASP-3 se pueden clonar por sondeo de ADNc o de genotecas provenientes de diferentes individuos, de acuerdo con procedimientos estándar, o se pueden identificar mediante una búsqueda de comparación de homología (por ejemplo, búsqueda BLAST) de bases de datos que contienen dicha información.

## II. La vía de la lectina: un nuevo concepto

### i. Generalidades: se ha redefinido la vía de la lectina

20 Como se describe en este documento, los inventores han realizado el sorprendente descubrimiento de que la vía de la lectina del complemento tiene dos brazos efectores para activar el complemento, ambos impulsados por complejos de activación de la vía de la lectina formados por componentes de reconocimiento de carbohidratos (MBL, CL-11 y ficolinas): i) el brazo efector formado por las serina proteasas asociadas a la vía de la lectina, MASP-1 y MASP-3, denominadas aquí "brazo efector 1 de la vía de la lectina" o "LEA-1", y (ii) el brazo efector de la activación, impulsado por la MASP-2, denominado en la presente memoria descriptiva como "brazo efector 2 de la vía de la lectina" o "LEA-2". Tanto el LEA-1 como el LEA-2 pueden efectuar la lisis y/o la opsonización.

También se ha determinado que la conversión del factor B independiente de la lectina por MASP-3 y la conversión independiente de la lectina del factor D por HTRA-1, MASP-1 y MASP-3, que pueden ocurrir en ausencia de  $Ca^{++}$ , comúnmente conducen a la conversión de C3bB a C3bBb y de pro-factor D a factor D. Por lo tanto, la inhibición de la MASP-3 puede inhibir tanto la LEA-1 como la activación independiente de la lectina del factor B y/o factor D, lo que puede provocar la inhibición de lisis y/o opsonización.

30 La figura 1 ilustra este nuevo concepto de las vías de activación del complemento. Tal como se muestra en la figura 1, el LEA-1 es impulsado por la MASP-3 unida a la lectina, lo cual puede activar el zimógeno del factor D en su forma activa y/o escindir el factor B unido a C3b o C3b(H<sub>2</sub>O), lo que conduce a la conversión del complejo de zimógeno C3bB en su forma enzimáticamente activa C3bBb. El factor D activado, generado por la MASP-3, también puede convertir los complejos de zimógenos C3bB o C3b(H<sub>2</sub>O) en su forma enzimáticamente activa. La MASP-1 es capaz de auto-activación rápida, mientras que la MASP-3 no tiene esta capacidad. En muchos casos, la MASP-1 es la activadora de la MASP-3.

40 Mientras en muchos ejemplos las lectinas (es decir, MBL, CL-11 o ficolinas) pueden dirigir la actividad hacia las superficies celulares, la figura 1 también describe las funciones independientes de lectina de la MASP-3, MASP-1 y HTRA-1 en la activación del factor B y/o en la maduración del factor D. Al igual que con la forma asociada a lectina de la MASP-3 en el LEA-1, la forma independiente de la lectina de la MASP-3 es capaz de mediar la conversión de C3bB o C3b(H<sub>2</sub>O) en C3bBb (véanse también las figuras 36 y 37) y el pro-factor en factor D (véase la figura 39). La MASP-1 (véase también la figura 39) y la proteína HTRA-1 no relacionada con la MASP también pueden activar el factor D (Stanton y colaboradores, *Evidence that HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration*, presentado en la conferencia de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología 2011, 4 de mayo de 2011) de una manera en la que no se requiere un componente de lectina.

45 Por lo tanto, la MASP-1 (a través de LEA-1 y las formas independientes de lectina), la MASP-3 (a través de LEA-1 y las formas independientes de lectina) y la HTRA-1 (solo la forma independiente de la lectina) son capaces de la activación directa o indirecta en uno o más puntos a lo largo de un eje MASP-3 - factor D - factor B. Al hacerlo, generan C3bBb, la C3 convertasa de la vía alternativa, y estimulan la producción y el depósito de C3b en las superficies microbianas. El depósito de C3b juega un papel crítico en la opsonización, etiquetando las superficies de los microbios para su destrucción por las células fagocíticas del hospedador, tales como los macrófagos. A modo de ejemplo en el presente documento (figura 35), la MASP-3 es crítica para la opsonización del *S. aureus*. El depósito de C3b ocurre rápidamente en el *S. aureus* expuesto al suero humano de una manera dependiente de la MASP-3 (figura 35).

Sin embargo, las contribuciones de LEA-1 y las funciones independientes de lectina de la MASP-3, la MASP-1 o la HTRA-1 no se limitan a la opsonización. Como se diagrama en la figura 1, estos tres componentes también pueden causar la lisis celular por activación indirecta o directa del factor B, y la producción de C3b. Estos componentes

forman complejos que generan la C5 convertasa de la vía alternativa, C3bBb (C3b)<sub>n</sub>. Como se describe aquí más adelante, el requisito de la MASP-3 y MBL, pero no así de la MASP-2 (y, por lo tanto, no de LEA-2 en este ejemplo), en la lisis del *N. meningitidis* (véanse las figuras 13, 14 y 15) demuestra que la LEA-1 desempeña una función en la lisis. En resumen, los resultados de opsonización obtenidos a partir de los estudios del *S. aureus* y los resultados de la lisis observados en los estudios del *N. meningitidis* respaldan la función que cumple la LEA-1 en ambos procesos (como se muestra en el diagrama de la figura 1). Además, estos estudios demuestran que tanto la opsonización como la lisis pueden ser el resultado de la conversión de C3bB o C3b(H<sub>2</sub>O) y/o del pro-factor D en factor D; por lo tanto, ambos procesos pueden ser el resultado de los roles independientes de la lectina de la MASP-3, MASP-1 o HTRA-1. En consecuencia, el modelo desarrollado por los inventores en la figura 1 apoya el uso de inhibidores principalmente de la MASP-3, pero también de la MASP-1 y/o de la HTRA-1, para bloquear la opsonización y/o la lisis y para tratar patologías causadas por la desregulación de estos procesos.

#### 1. Brazo efector de la vía de la lectina (LEA-1)

El primer brazo efector de la vía de la lectina, el LEA-1, está formado por las serina proteasas MASP-1 y MASP-3 asociadas a la vía de la lectina. Como se describe en el presente documento, los inventores han demostrado ahora que, en ausencia de la MASP-3 y en presencia de la MASP-1, la vía alternativa no se activa de manera efectiva en las estructuras superficiales. Estos resultados demuestran que la MASP-3 juega un papel no conocido hasta el momento en el inicio de la vía alternativa, lo cual se confirma usando el suero de un paciente con 3MC con deficiencia en MASP-3 obtenido de pacientes con el raro trastorno autosómico recesivo 3MC (Rooryck C, y colaboradores, Nat. Genet. 43 (3): 197-203 (2011)), con mutaciones que hacen disfuncional el dominio serina proteasa de la MASP-3. Sobre la base de estos hallazgos novedosos, se espera que la activación del complemento que implica la vía alternativa, como se define convencionalmente, sea dependiente de la MASP-3. De hecho, la MASP-3 y su activación de LEA-1 pueden representar el iniciador hasta el momento esquivo de la vía alternativa.

Como se describe en mayor detalle en los ejemplos 1-4 de la presente memoria descriptiva, en sueros con deficiencia en MASP-2, los inventores observaron una mayor actividad de activación de la vía alternativa dependiente de la lectina, que da como resultado una actividad bactericida mayor (es decir, actividad lítica) contra el *N. meningitidis*. Lejos de aceptar las limitaciones impuestas por ninguna teoría en particular, se cree que en ausencia de la MASP-2, los complejos de reconocimiento de carbohidratos que portan MASP-1 son más propensos a unirse cerca de los complejos de reconocimiento de carbohidratos portadores de MASP-3 para activar a la MASP-3. Se sabe que, en muchos casos, la activación de la MASP-3 depende de la actividad de la MASP-1, ya que la MASP-3 no es una enzima autoactivante y muy a menudo requiere que la actividad de la MASP-1 se convierta desde su forma de zimógeno en su forma enzimáticamente activa. La MASP-1 (como la MASP-2) es una enzima autoactivante, mientras que la MASP-3 no se autoactiva y, en muchos casos, necesita la actividad enzimática de la MASP-1 para convertirse en su forma enzimáticamente activa. Véase, Zundel S, y col., *J. Immunol.*, 172 (7): 4342 - 50 (2004). En ausencia de la MASP-2, todos los complejos de reconocimiento de la vía de la lectina están cargados con MASP-1 o MASP-3. Por lo tanto, la ausencia de la MASP-2 facilita la conversión de la MASP-3 mediada por la MASP-1 en su forma enzimáticamente activa. Una vez que se activa la MASP-3, esta MASP-3 activada inicia la activación de la vía alternativa, ahora denominada activación "LEA-1", a través de una conversión mediada por la MASP-3 de C3bB en C3bBb y/o la conversión del pro-factor D en factor D. La C3bBb, también conocida como C3 convertasa de la vía alternativa, escinde moléculas C3 adicionales que producen el depósito de moléculas opsónicas de C3b. Si varios fragmentos de C3b se unen en estrecha proximidad al complejo C3bBb convertasa, esto da como resultado la formación de la C5 convertasa de la vía alternativa, C3bBb(C3b)<sub>n</sub>, que promueve la formación de MAC. Además, las moléculas de C3b depositadas en la superficie forman nuevos sitios para la unión del factor B, que ahora puede escindirse mediante el factor D y/o la MASP-3, para formar otros sitios en los que se pueden formar complejos de C3 y C5 convertasa de la vía alternativa. Este último proceso es necesario para la lisis efectiva y no requiere lectinas una vez que se ha producido el depósito inicial de C3b. Una publicación reciente (Iwaki D. y col., *J Immunol* 187 (7): 3751-8 (2011)) así como los datos generados a partir de los inventores (figura 37) demuestran que la vía alternativa C3 convertasa zimógeno complex C3bB es convertido en su forma enzimáticamente activa por MASP-3 activado. Los inventores ahora han descubierto que la escisión mediada por MASP-3 del factor B representa un subcomponente de la LEA-1 recientemente descrita, que promueve la formación dependiente de la lectina de la vía alternativa C3 convertasa C3bBb.

#### 2. Brazo efector de la vía de la lectina (LEA-2)

El segundo brazo efector de la vía de la lectina, LEA-2, está formado por la serina proteasa MASP-2 asociada a la vía de la lectina. La MASP-2 se activa al unirse a los componentes de reconocimiento a su patrón respectivo, y también puede ser activada por la MASP-1, y posteriormente divide el componente C4 del complemento en C4a y C4b. Después de la unión del producto de división C4b al C2 del plasma, el C2 unido a C4b se convierte en el sustrato de una segunda etapa de división mediada por la MASP-2, que convierte el C2 unido al C4b en el complejo enzimáticamente activo C4bC2a y un pequeño fragmento de escisión C2b. C4b2a es la C3 convertasa convertidora de C3 de la vía de la lectina, que convierte el abundante componente C3 plasmático en C3a y C3b. El C3b se une a cualquier superficie cercana mediante un enlace tioéster. Si varios fragmentos C3b se unen en estrecha proximidad al complejo de C3 convertasa, C4b2a, esta convertasa altera su especificidad para convertir C5 en C5b y C5a, formando el complejo de C5 convertasa, C4b2a(C3b)<sub>n</sub>. Si bien esta C5 convertasa puede iniciar la formación de

MAe, se cree que este proceso no es lo suficientemente efectivo como para promover la lisis por sí mismo. Más bien, las C3b opsoninas iniciales producidas por LEA-2 forman el núcleo para la formación de nuevos sitios C3 convertasa y C5 convertasa de la vía alternativa, que en última instancia conducen a una abundante formación y lisis de MAC. Este último evento está mediado por la activación del factor B a instancias del factor D, asociada con C3b formada por LEA-2, y por lo tanto depende de LEA-1 en virtud del papel esencial de la MASP-1 en la maduración del factor D. También hay una vía de activación de bypass C4 dependiente de la MASP-2 para activar C3 en ausencia de C4, que desempeña un papel importante en la fisiopatología de la lesión por isquemia-reperusión, ya que los ratones con deficiencia de C4 no están protegidos contra la lesión por isquemia-reperusión mientras que los ratones con deficiencia de la MASP-2 sí lo están (Schwaeble y colaboradores *PNAS*, 2011 *supra*). El LEA-2 también está relacionado con la vía de coagulación, que implica la división de protrombina en trombina (vía común) y también la escisión del factor XII (factor de Hageman) para convertirse en su forma enzimáticamente activa XIIa. El factor XIIa, a su vez, escinde el factor XI en XIa (vía intrínseca). La activación de la vía intrínseca de la cascada de coagulación conduce a la formación de fibrina, que es de importancia crítica para la formación de trombos.

La figura 1 ilustra el nuevo concepto de la vía de la lectina y la vía alternativa sobre la base de los resultados proporcionados en este documento. La figura 1 delinea el papel del LEA-2 en la opsonización y la lisis. Si bien la MASP-2 es el iniciador del depósito de C3b "corriente abajo" (y la opsonización resultante) en múltiples configuraciones dependientes de lectina fisiológicamente (figuras 20A, 20B, 20C), también desempeña una función en la lisis de las bacterias sensibles al suero. Como se ilustra en la figura 1, el mecanismo molecular propuesto responsable del aumento de la actividad bactericida del suero/plasma con deficiencia en MASP-2 o sin MASP-2 para patógenos sensibles al suero, tales como *N. meningitidis* es que, para la lisis de las bacterias, los complejos de reconocimiento de la vía de la lectina asociados con MASP-1 y MASP-3 tienen que unirse muy cerca el uno del otro en la superficie bacteriana, permitiendo así que la MASP-1 escinda MASP-3. En contraposición a la MASP-1 y a la MASP-2, la MASP-3 no es una enzima autoactivante, pero en muchos casos requiere activación/escisión mediada por la MASP-1 para convertirse en su forma enzimáticamente activa.

Como se muestra además en la figura 1, la MASP-3 activada puede escindir el factor B unido a C3b en la superficie del patógeno para iniciar la cascada de activación alternativa mediante la formación de las C3 y C5 convertasas de la vía alternativa enzimáticamente activa, C3bBb y C3bBb(C3b)<sub>n</sub>, respectivamente. Los complejos de activación de la vía de la lectina portadoras de la MASP-2 no participan en la activación de la MASP-3 y, en ausencia de la MASP-2 o después de su agotamiento; todos los complejos de activación de la vía de la lectina se cargarán con MASP-1 o MASP-3. Por lo tanto, en ausencia de la MASP-2, la probabilidad de que en la superficie microbiana los complejos de activación de la vía de la lectina que portan MASP-1 y MASP-3 lleguen a estar muy cerca el uno del otro aumenta sensiblemente, dando lugar a que se active más MASP-3 y, por lo tanto, conduciendo a una mayor tasa de escisión mediada por la MASP-3 del factor B unido a C3b, para formar las C3 y C5 convertasas de la vía alternativa, C3bBb y C3bBb(C3b)<sub>n</sub> en la superficie microbiana. Esto conduce a la activación de las cascadas de activación terminal C5b-C9 que forman el complejo de ataque a la membrana, compuesto por C5b unido a la superficie asociado con C6, C5bC6 asociado con C7, C5bC6C7 asociado con C8 y C5bC6C7C8, lo cual conduce a la polimerización de C9 que se inserta en la estructura de la superficie bacteriana y forma un poro en la pared bacteriana, lo cual deriva en la destrucción osmótica de la bacteria dirigida al complemento.

La esencia de este concepto novedoso es que los datos proporcionados en este documento muestran claramente que los complejos de activación de la vía de la lectina impulsan las siguientes dos vías de activación distintas, como se ilustra en la figura 1:

i) LEA-1: una vía de activación dependiente de la MASP-3 que inicia e impulsa la activación del complemento generando la convertasa de la vía alternativa, C3bBb, a través de la escisión inicial y activación del factor B en las superficies del activador, lo cual catalizará luego el depósito de C3b y la formación de la convertasa C3bBb de vía alternativa. La vía de activación impulsada por la MASP-3 desempeña un papel esencial en la opsonización y lisis de los microbios e impulsa la vía alternativa en la superficie de las bacterias, conduciendo a índices óptimos de activación para generar complejos de ataque a la membrana; y

ii) LEA-2: una vía de activación dependiente de la MASP-2 que conduce a la formación de la C3 convertasa de la vía de la lectina, C4b2a, y, tras la acumulación del producto de escisión de C3, C3b, posteriormente a la C5 convertasa, C4b2a(C3b)<sub>n</sub>. En ausencia de C4 del complemento, la MASP-2 puede formar un complejo de C3 convertasa alternativo, que involucra a C2 y al factor de coagulación XI.

Además de su papel en la lisis, la vía de activación impulsada por la MASP-2 desempeña una función importante en la opsonización bacteriana, lo cual conduce a que los microbios se recubran con C3b unido por enlaces covalentes y a los productos de escisión de los mismos (es decir, iC3b y C3dg), que se dirigirán para la captación y destrucción por acción de los fagocitos portadores del receptor de C3, tales como los granulocitos, macrófagos, monocitos, células microgliales y el sistema reticuloendotelial. Esta es la vía más efectiva de eliminación de bacterias y microorganismos que son resistentes a la lisis del complemento. Estos incluyen la mayoría de las bacterias gram positivas.

Además de LEA-1 y LEA-2, existe el potencial para la activación independiente de la lectina del factor D por la MASP-3, la MASP-1 y/o la HTRA-1, y también existe el potencial para la activación independiente de la lectina del factor B por acción de la MASP-3.

- 5 Lejos de aceptar las imposiciones de ninguna teoría en particular, se cree que cada uno de los siguientes: (i) LEA-1, (ii) LEA-2 y (iii) activación independiente de la lectina del factor B y/o factor D conducen a la opsonización y/o a la formación de MAC con la lisis resultante.

ii. Antecedentes de la MASP-1, la MASP-2 y la MASP-3

10 En la actualidad se sabe que tres serina proteasas asociadas a la lectina de unión a manano (MASP-1, MASP-2 y MASP-3) se asocian en el suero humano con la lectina de unión a manano (MBL). La lectina de unión a manano también se denomina "proteína de unión a manosa" o "lectina de unión a manosa" en la reciente bibliografía. El complejo MBL-MASP juega un papel importante en la inmunidad innata en virtud de la unión de MBL a las estructuras de carbohidratos presentes en una amplia variedad de microorganismos. La interacción de MBL con matrices específicas de estructuras de carbohidratos provoca la activación de las proenzimas de la MASP que, a su vez, activan el complemento escindiendo los componentes C4 y C2 del complemento, para formar la C3 convertasa C4b2b (Kawasaki y colaboradores, *J Biochem* 106: 483 -489 (1989); Matsushita y Fujita, *J Exp Med.* 176: 1497 - 1502 (1992); Ji y col., *J Immunol* 150: 571 - 578 (1993)).

20 Hasta hace poco, se consideraba que el complejo proenzimático MBL-MASP contenía solo un tipo de proteasa (MASP-1), pero ahora está claro que hay otras dos proteasas distintas (es decir, MASP-2 y MASP-3) asociadas con la MBL (Thiel y colaboradores, *Nature* 386: 506 - 510 (1997); Dahl y col., *Immunity* 15: 127 - 135 (2001)), así como una proteína sérica adicional de 19 kDa, denominada "MAp19" o "sMAP" (Stover y colaboradores, *J Immunol* 162: 3481 - 3490 (1999); Stover y col., *J Immunol* 163: 6848 - 6859 (1999); Takahashi y colaboradores, *Int. Immunol* 11: 859 - 63 (1999)).

25 La MAp19 es un producto génico empalmado de manera alternativa del gen estructural para la MASP-2 y carece de los cuatro dominios C-terminales de la MASP-2, que incluye el dominio de serina endopeptidasa. El transcrito de ARNm truncado expresado en abundancia que codifica a la MAp19 se genera mediante un evento de empalme/poliadenilación alternativo del gen de la MASP-2. Mediante un mecanismo similar, el gen de la MASP-1/3 da lugar a tres productos génicos principales, las dos serina proteasas MASP-1 y MASP-3 y un producto génico truncado de 44 kDa, denominado "MAp44" (Degn y colaboradores, *J Immunol* 183 (11): 7371-8 (2009); Skjoedt y col., *J Biol Chem* 285: 8234-43 (2010)).

30 La MASP-1 se describió primero como el componente de proteasa P-100 del factor reactivo Ra del suero, que ahora se reconoce como un complejo compuesto por MBL más MASP (Matsushita y col., *Collectins and Innate Immunity*, (1996); Ji y colaboradores al., *J Immunol* 150: 571- 578 (1993). La capacidad de una endopeptidasa asociada a la MBL dentro del complejo MBL-MASPs para actuar sobre los componentes del complemento C4 y C2 de una manera aparentemente idéntica a la de la enzima C1s dentro del complejo C1q-(C1r)<sub>2</sub>-(C1s)<sub>2</sub> de la vía clásica del complemento sugiere que hay un complejo MBL-MASPs que es funcionalmente análogo al complejo C1q-(C1r)<sub>2</sub>-(C1s)<sub>2</sub>. El complejo C1q-(C1r)<sub>2</sub>-(C1s)<sub>2</sub> se activa por la interacción de C1q con las regiones Fe del anticuerpo IgG o IgM presente en inmunocomplejos. Esto provoca la autoactivación de la proenzima C1r que, a su vez, activa la proenzima C1s que luego actúa sobre los componentes del complemento C4 y C2.

40 La estequiometría del complejo MBL-MASPs difiere de la encontrada para el complejo C1q-(C1r)<sub>2</sub>-(C1s)<sub>2</sub> en que diferentes oligómeros de la MBL parecen asociarse con diferentes proporciones de MASP-1/MAp19 o MASP-2/MASP-3 (Dahl y col., *Immunity* 15: 127-135 (2001). La mayoría de las MASP y MAp19 encontradas en el suero no forman complejo con la MBL (Thiel y col., *J Immunol* 165: 878-887 (2000)) y puede asociarse en parte con ficolinas, un grupo de lectinas recientemente descrito que tiene un dominio similar al fibrinógeno capaz de unirse a residuos de N-acetilglucosamina en superficies microbianas (Le y colaboradores, *FEBS Lett* 425: 367 (1998); Sugimoto y colaboradores, *J Biol Chem* 273: 20721 (1998)). Entre estos, la L-ficolina, la H-ficolina y la M-ficolina humanas se asocian con MASP y con MAp19 y pueden activar la vía de la lectina al unirse a las estructuras específicas de carbohidratos reconocidas por las ficolinas. (Matsushita y col., *J Immunol* 164: 2281-2284 (2000); Matsushita y col., *J Immunol* 168: 3502-3506 (2002)). Además de las ficolinas y de la MBL, una lectina similar a la MBL, colectina, llamada CL-11, se ha identificado como una molécula de reconocimiento de la vía de la lectina (Hansen y colaboradores *J Immunol* 185: 6096 - 6104 (2010); Schwaebler y col. PNAS 108: 7523 - 7528 (2011)). Existe evidencia abrumadora que subraya la importancia fisiológica de estas moléculas alternativas de reconocimiento de los carbohidratos y por lo tanto, es importante entender que la MBL no es el único componente de reconocimiento de la vía de activación de la lectina y que la deficiencia en MBL no debe confundirse con la deficiencia de la vía de la lectina. La existencia posiblemente de una variedad de complejos alternativos de reconocimiento de carbohidratos relacionados estructuralmente con MBL puede ampliar el espectro de estructuras microbianas que inician una respuesta directa del sistema inmunitario innato a través de la activación del complemento.

55 Todas las moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina se caracterizan por un motivo de unión a MASPs específico dentro de su región de tallo homólogo de colágeno (Wallis y col., *J Biol Chem* 279: 14065-14073 (2004)).

El sitio de unión de la MASP en MBL, CL-11 y ficolinas, se caracteriza por un motivo distinto dentro de este dominio: Hyp-Gly-Lys-Xaa-Gly-Pro, donde Hyp es hidroxiprolina y Xaa es generalmente un residuo alifático. Las mutaciones puntuales en esta secuencia interrumpen la unión de la MASP.

#### 1. Respectivas estructuras, secuencias, localización cromosómica y variantes de empalme

5 La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio del polipéptido de MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y el polipéptido de MASP-19 (ID. DE SEC. N.º 2) y los exones que codifican el mismo. La figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio del polipéptido de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), del polipéptido de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y del polipéptido de MASP-44 (ID. DE SEC. N.º II) y los exones que codifican el mismo. Como se muestra en las figuras 2 y 3, las serina proteasas MASP-1, MASP-2 y MASP-3 consisten en seis dominios distintos, dispuestos como se encuentran en C1r y C1s; es decir, (I) un dominio N-terminal C1r/C1s/erizo de mar/VEGF/morfogénico del hueso (o CUBI); (II) un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*); (III) un segundo dominio CUB (CUBII); (IV y V) dos dominios de la proteína de control del complemento (CCP1 y CCP2); y (VI) un dominio de serina proteasa (SP).

15 Las secuencias de aminoácidos derivadas del ADNc de la MASP-1 humana y de ratón (Sato y col., *Int Immunol* 6: 665-669 (1994); Takada y col., *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1003-1009 (1993); Takayama y col., *J Immunol* 152: 2308-2316 (1994)), la MASP-2 humana, de ratón y de rata (Thiel y colaboradores, *Nature* 386: 506-510 (1997); Endo y colaboradores, *J Immunol* 161: 4924 - 30 (1998); Stover y colaboradores, *J Immunol* 162: 3481 - 3490 (1999); Stover y colaboradores, *J Immunol* 163: 6848 - 6859 (1999)), así como la MASP-3 humana (Dahl y colaboradores al., *Immunity* 15: 127-135 (2001)) indican que estas proteasas son serina peptidasas que tienen la tríada característica de los restos His, Asp y Ser dentro de sus supuestos dominios catalíticos (Números de acceso del Genbank: MASP-1 humana: BAA04477.1; MASP-1 de ratón: BAA03944; MASP-1 de rata: AJ457084; MASP-3 humana: AAK84071; MASP-3 de ratón: AB049755, según el acceso al Genbank realizado el 15/2/2012).

20 Como se muestra adicionalmente en las figuras 2 y 3, tras la conversión del zimógeno a la forma activa, la cadena pesada (alfa, o cadena A) y la cadena ligera (beta o B) se dividen para producir una cadena A unida por disulfuro y una cadena B más pequeña que representa el dominio de serina proteasa. La proenzima monocatenaria de la MASP-1 se activa (como la proenzima C1r y C1s) mediante la escisión de un enlace Arg-Ile localizado entre el segundo dominio CCP (dominio V) y el dominio de serina proteasa (dominio VI). Las proenzimas MASP-2 y MASP-3 se consideran activadas de una forma similar a la de la MASP-1. Cada proteína de la MASP forma homodímeros y se asocia individualmente con MBL y las ficolinas de una manera dependiente de Ca<sup>++</sup>.

#### 30 2. MASP-1/3

El polipéptido de MASP-1 humana (ID. DE SEC. N.º 10) y el polipéptido de MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) surgen de un gen estructural (Dahl y colaboradores, *Immunity* 15: 127-135 (2001), que ha sido mapeado a la región 3q27-28 del brazo largo del cromosoma 3 (Takada y colaboradores, *Genomics* 25: 757-759 (1995)). Los transcritos de ARNm MASP-3 y MASP-1 se generan a partir del transcrito primario mediante un proceso alternativo de empalme/poliadenilación. El producto de traducción MASP-3 está compuesto por una cadena alfa, que es común a MASP-1 y MASP-3, y una cadena beta (el dominio de serina proteasa), que es exclusiva de la MASP-3. Tal como se muestra en la figura 3, el gen MASP-1 humana abarca 18 exones. El cADN de la MASP-1 humana (expresado como ID. DE SEC. N.º 9) está codificado por los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 y 18. Como se muestra adicionalmente en la figura 3, el gen humano de la MASP-3 abarca doce exones. El ADNc de la MASP-3 humana (expresado como SEC ID N.º: 7) está codificado por los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12. Un empalme alternativo da como resultado una proteína denominada proteína asociada 44 asociada a MBL ("MAp44") (expresada como ID. DE SEC. N.º 11), que surge de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

45 El polipéptido de la MASP-1 humana (ID. DE SEC. N.º 10 de Genbank BAA04477.1) tiene 699 residuos de aminoácidos, que incluye un péptido líder de 19 residuos. Cuando se omite el péptido líder, la masa molecular calculada de la MASP-1 es de 76,976 Da. Tal como se muestra en la figura 3, la secuencia de aminoácidos de la MASP-1 contiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N. Los dominios de la proteína de la MASP-1 humana (con referencia a ID. DE SEC. N.º 10) se muestran en la figura 3 e incluyen un dominio de la proteína morfogénica N-terminal C1r/C1s/ VEGF/ósea de erizo de mar (CUBI) (aa 25-137 de la ID. DE SEC. N.º 10), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (aa 139-181 de ID. DE SEC. N.º 10), un segundo dominio CUB (CUBII) (aa 185-296 de la ID. DE SEC. N.º 10), así como un tándem de dominios de proteína de control del complemento (CCP1 aa 301-363 y CCP2 aa 367-432 de la ID. DE SEC. N.º 10) y un dominio de serina proteasa (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10).

55 El polipéptido MASP-3 humana (ID. DE SEC. N.º 8, de Genbank AAK84071) tiene 728 residuos de aminoácidos, que incluyen un péptido líder de 19 residuos. Cuando se omiten los péptidos líderes, la masa molecular calculada de la MASP-3 es 81,873 Da. Tal como se muestra en la figura 3, hay siete sitios de glicosilación unida a N en la MASP-3. Los dominios de la proteína de la MASP-3 humana (con referencia a la ID. DE SEC. N.º 8) se muestran en la figura 3 e incluyen un dominio proteína morfogénica N-terminal C1r/C1s/ VEGF/ósea de erizo de mar (CUBI) (aa 25-137 de ID. DE SEC. N.º 8), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (aa 139-181 de ID. DE SEC. N.º 8), un

segundo dominio CUB (CUBII) (aa 185-296 de la ID. DE SEC. N.º 8), así como un tándem de dominios de proteína de control del complemento (CCP1 aa 301-363 y CCP2 aa 367-432 de la ID. DE SEC. N.º 8) y un dominio de serina proteasa (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8).

- 5 El producto de traducción de la MASP-3 está compuesto por una cadena alfa (cadena pesada) que contiene los dominios CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2 (cadena alfa: aa 1-448 de la ID. DE SEC. N.º 8) que es común a la MASP-1 y a la MASP-3, y a una cadena ligera (cadena beta: aa 449-728 de la ID. DE SEC. N.º 8), que contiene el dominio de serina proteasa, que es exclusivo de la MASP-3 y de la MASP-1.

### 3. MASP-2

- 10 El gen de la MASP-2 humana está localizado en el cromosoma 1p36.3-2 (Stover y colaboradores, *Cytogenet and Cell Genet* 84: 148-149 (1999) y abarca doce exones, tal como se muestra en la figura 2. La MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y la MASP19 (ID. DE SEC. N.º 2) están codificados por transcritos de un solo gen estructural generado por empalme alternativo/poliadenilación (Stover y colaboradores, *Genes and Immunity* 2: 119 - 127 (2001)). El ADNc de la MASP-2 humana (ID. DE SEC. N.º 4) está codificado por los exones 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. La proteína de 20 kDa se denomina proteína 19 asociada a MBL ("MAP19", también denominada "sMAP") (ID. DE SEC. N.º 2),  
15 codificada por la (ID. DE SEC. N.º 1), surge de los exones 2, 3, 4 y 5. La MASP19 es una proteína no enzimática que contiene la región N-terminal CUB1-EGF de la MASP-2 con cuatro residuos adicionales (EQSL) derivada del exón 5, tal como se muestra en la figura 2.

- 20 El polipéptido de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) tiene 686 residuos de aminoácidos, que incluye un péptido líder de 15 residuos que se escinde después de la secreción, dando como resultado la forma madura de la MASP-2 humana (ID. DE SEC. N.º 6). Tal como se muestra en la figura 2, la secuencia de aminoácidos de la MASP-2 no contiene ningún sitio de glucosilación unido a N. El polipéptido de la MASP-2 exhibe una estructura molecular similar a MASP-1, MASP-3 y C1r y C1s, las proteasas del sistema del complemento de C1. Los dominios de la proteína de la MASP-2 humana (numerada con referencia a la ID. DE SEC. N.º 5) se muestran en la figura 2 e incluyen un dominio de proteína morfogénica N-terminal C1r/C1s/VEGF/ósea de erizo de mar (CUBI) (aa 24- 136 de la ID. DE SEC. N.º 5),  
25 un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (aa 138-180 de la ID. DE SEC. N.º 5), un segundo dominio CUB (CUBII) (aa 184-295 de la ID. DE SEC. N.º 5), como así también un tándem de dominios de proteínas de control del complemento (CCP1 aa 300-359 y CCP2 aa 364-431 de la ID. DE SEC. N.º 5) y un dominio de serina proteasa (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5).

- 30 Tal como se muestra en la figura 2, el polipéptido de la MASP-2 tiene una cadena alfa (cadena pesada) que contiene los dominios CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2 (cadena alfa: aa 1-443 de ID. DE SEC. N.º 5) y una cadena beta (cadena ligera) que contiene el dominio de serina proteasa (cadena beta: aa 444-686). Los dominios CUB-1, EGF y CUB-2 son necesarios para la dimerización, y los dominios CUB-1, EGF, CUB-2 y CCP-1 contienen el sitio de unión para la MBP. Como se describe en Wallis y colaboradores, *J Biol Chem* 279: 14065-14073 (2004), cada dímero de la MASP-2 se une a dos subunidades de MBL.

### 35 4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de MASP-1, MASP-2 y MASP-3

La figura 4 es una alineación de aminoácidos de las secuencias de proteínas de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 6) y MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8), que muestra los dominios CUBI, EGF, CUBII, CCP1, CCP2 y los residuos conservados de la tríada catalítica (H, D, S) en los dominios de serina proteasa (SP). El símbolo "." indica una secuencia de aminoácidos idéntica.

- 40 La figura 5 es una alineación de aminoácidos de las secuencias de la cadena alfa, incluida la CUBI-EGF-CUBII-CCP1-CCP2, de la MASP-1 (cadena alfa: aa 1-447 de la ID. DE SEC. N.º 10), de la MASP-2 (cadena alfa: aa 1-443 de la ID. DE SEC. N.º 5) y de la MASP-3 (cadena alfa: aa 1-448 de la ID. DE SEC. N.º 8). Existen numerosos parches de identidad en los dominios CUBI, EGF y CUBII, tal como lo indican los recuadros de puntos en la figura 5. Los dominios CCP1 y CCP2 están indicados por los recuadros oscuros sombreados. El porcentaje global de identidad entre las cadenas alfa de las MASP 1/3 humanas y de la MASP-2 humana se proporciona a continuación,  
45 en la tabla 1.

- La figura 6 es una alineación de aminoácidos de las secuencias de la cadena beta (que incluyen los dominios de la serina proteasa) de la MASP-1 (cadena beta: aa 448-699 de la ID. DE SEC. N.º 10), de la MASP-2 (cadena beta: aa 444-686 de la ID. DE SEC. N.º 5) y de la MASP-3 (cadena beta: aa 449-728 de la ID. DE SEC. N.º 8). La figura 7A muestra una alineación de aminoácidos por pares entre las secuencias de la cadena beta de la MASP-1 (cadena beta: aa 448-699 de la ID. DE SEC. N.º 10) y de la MASP-2 (cadena beta: aa 444-686 de la ID. DE SEC. N.º 5) La figura 7B muestra una alineación de aminoácidos por pares entre las secuencias de la cadena beta de la MASP-1 (cadena beta: aa 448-699 de la ID. DE SEC. N.º 10) y de la MASP-3 (cadena beta: aa 449-728 de la ID. DE SEC. N.º 8) La figura 7C muestra una alineación de aminoácidos por pares entre las secuencias de la cadena beta de la MASP-2 (cadena beta: aa 444- 686 de la ID. DE SEC. N.º 5) y de la MASP-3 (cadena beta: aa 449-728 de la ID. DE SEC. N.º 8) Las regiones de identidad en las figuras 5-7 se muestran como recuadros punteados que rodean los aminoácidos idénticos (mostrados como el símbolo ".").

El porcentaje de identidad entre las cadenas alfa y beta de las proteínas de las MASP-1, MASP-2 y MASP-3 humanas se proporciona en la tabla 1, presentada a continuación.

Tabla 1: porcentaje de identidad entre las proteínas de la MASP humana

	Porcentaje de identidad entre las cadenas A			Porcentaje de identidad entre las cadenas B		
	MASP-1	MASP-2	MASP-3	MASP-1	MASP-2	MASP-3
MASP-1	100 %	45,6 %	98 %	100 %	27 %	27 %
MASP-2	45,6 %	100 %	45,4 %	27 %	100 %	28,6 %
MASP-3	98 %	45,4 %	100 %	27 %	28,6 %	100 %

5 Con respecto a las cadenas alfa (cadenas pesadas), como se indicó anteriormente en la tabla 1, las cadenas alfa de las MASP-1 y MASP-3 son idénticas (excepto para la secuencia de 15 aminoácidos en el extremo 3'). El porcentaje total de identidad entre la cadena alfa de las MASP-2 y MASP-3 es del 45,4 %, con numerosos parches de identidad en los dominios CUBI-EGF-CUBII, tal como se muestra en la figura 5.

10 Con respecto a las cadenas beta (cadenas ligeras), el porcentaje global de identidad entre las tres cadenas beta es bajo, en el intervalo de 27 % a 28 %. Sin embargo, aunque la identidad global entre las tres cadenas B es baja, existen numerosos parches de identidad, tal como se muestra en la figura 6. Como se muestra adicionalmente en las figuras 7A-C, los parches idénticos de secuencia se distribuyen más ampliamente entre las MASP-2 y 3 que entre la 1 y 2 o la 1 y 3.

15 Todos los residuos de cisteína presentes en MASP-2, MASP-3, C1r y C1s se alinean con residuos equivalentes en la MASP-1; sin embargo, la MASP-1 tiene dos residuos de cisteína (en las posiciones 465 y 481 en la cadena L) que no se encuentran en MASP-2, MASP-3, C1r y C1s. Estos dos residuos de cisteína en la MASP-1 están en las posiciones esperadas usadas para formar el puente disulfuro de "histidina-loop", que se encuentra en la tripsina y en la quimotripsina. Esto sugiere que la MASP-2, la MASP-3, C1r y C1s pueden haber evolucionado, por duplicación y divergencia de genes, a partir de la MASP-1 (Nonaka y Miyazawa, *Genome Biology* 3 Reviews 1001.1-1001.5 (2001)).

20 5. Funciones/actividades biológicas respectivas, incluidos los datos genéticos humanos pertinentes

25 El papel de los complejos MBL/Ficolina-MASPs en la inmunidad innata está mediado por la unión dependiente de calcio de los dominios de lectina tipo C (presentes en la molécula MBL) o mediante la unión de los dominios similares a fibrinógeno (presentes en la molécula de ficolina) a las estructuras de carbohidratos que se encuentran en la levadura, bacterias, virus y hongos. Esta fase de reconocimiento provoca la activación de la proenzima MASP-2, que luego imita la acción de los C1s activados dentro del complejo C1q-(C1r)2-(C1s) 2 al escindir C4 y C2 para formar la C3 convertasa C4b2b. Esto permite el depósito de C4b y C3b sobre los patógenos diana y, por lo tanto, promueve la eliminación y la depuración a través de la fagocitosis.

30 La evidencia en la bibliografía reciente sugiere que el complejo de activación de la vía de la lectina solo requiere la actividad de la MASP-2 para escindir C4 y C2: i) la reconstitución de un complejo de activación de lectina-camino mínimo usando MBL recombinante y la MASP-2 expresada de forma recombinante parecen ser suficientes para escindir efectivamente tanto C4 como C2 *in vitro* (Vorup Jensen y col., *J Immunol* 165: 2093-2100 (2000); Rossi y col., *J Biol Chem* 276: 40880-40887 (2001); Ambrus y col., *J Immunol* 170: 1374 - 1382 (2003); Gál y col., *J Biol Chem* 280: 33435 - 33444 (2005)); mientras que ii) el suero de ratones con una deficiencia de la MASP-2 dirigida a genes está desprovisto de toda actividad funcional de la vía de la lectina (Schwaeble y colaboradores, *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)). Recientemente, se describió una deficiencia genéticamente determinada de la MASP-2 (Stengaard-Pedersen y colaboradores, *New Eng. J Med.* 349: 554-560, (2003)). La mutación de un único nucleótido conduce a un intercambio Asp-Gly en el dominio CUB1 y hace que la MASP-2 sea incapaz de unirse a MBL.

35 Además, la caracterización funcional de sueros de ratones con deficiencia tanto en MASP-1 como en MASP-3 muestra que la actividad de la vía de la lectina es más lenta, pero que no está ausente cuando se comparan sueros de ratones de tipo salvaje y MASP-1/MASP-3 knockout (MASP-1/3<sup>-/-</sup>) en condiciones fisiológicas (Takahashi y col., *J Immunol* 180: 6132 - 6138 (2008); Schwaeble y colaboradores, *PNAS* (2011)). Estos estudios sugieren que, en contraste con la endopeptidasa efectora C1s de la vía clásica, la activación de la MASP-2 no implica o requiere esencialmente la actividad de ninguna de las otras serina endopeptidasas asociadas a MBL (es decir, MASP-1 o MASP-3) y que la actividad proteolítica de la MASP-2 es suficiente para traducir la unión de las moléculas de reconocimiento de carbohidratos de la vía de la lectina (es decir, MBL, ficolinas o CL-11) en la activación del complemento. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que mientras que la MASP-2 tiene la capacidad

de autoactivarse, la tasa catalítica de activación de la MASP-1 del zimógeno de la MASP-2 excede la de la escisión de la MASP-2 de su propia forma de zimógeno en aproximadamente 85.000 veces (Héja y colaboradores, *PNAS* 106: 10498 - 503 (2011); Megyeri y col., *J. Biol. Chem.* 288 (13): 8922 - 34 (2013)). Por lo tanto, es probable que el activador primario de la MASP-2 en entornos fisiológicos sea la MASP-1. A juzgar por el tamaño de los fragmentos de C4 generados y la actividad funcional de la C3 convertasa generada, parece probable que la MASP-2 activada escinda C4 y C2 de manera idéntica a la llevada a cabo por C1s activado, es decir, en un único enlace arginilo (Arg76 Ala77) dentro de la cadena alfa de C4 y en un único enlace arginilo (Arg223 Lys224) dentro de la cadena de proenzimas con la C2. También se ha informado que la MASP de ratón (en forma del complejo MBL-MASP de ratón designado como factor Ra-reactivo) puede, a diferencia de C1s, escindir la cadena alfa del componente C3 del complemento para producir los fragmentos biológicamente activos C3a y C3b (Ogata et al, *J. Immunol* 154: 2351 - 2357 (1995)). Si esto tuviera lugar en el sistema humano, requeriría la escisión de un único enlace arginilo (Arg77 Ser78) dentro de la cadena alfa de C3. La MASP-2 activada, al igual que los C1s activada, no puede escindir el componente C5 del complemento. Las actividades proteolíticas de la MASP-1 y de la MASP-2 son inhibidas por el inhibidor de C1 (Matsushita y colaboradores, *J. Immunol* 165: 2637-2642 (2000) mientras que el inhibidor de C1 no reacciona con la MASP-3 (Dahl y colaboradores, *Immunity* 15: 127 - 135 (2001); Zundel y colaboradores, *J. Immunol* 172: 4342 - 4350 (2004)).

Las funciones biológicas de la MASP-1 y de la MASP-3 han tardado en aparecer. La especificidad del sustrato y el papel fisiológico de la MASP-1 han sido un tema de debate desde su descubrimiento. Numerosos sustratos potenciales han sido identificados durante los últimos años. Se sugirió que la MASP-1 puede escindir la C3 nativa lentamente, y esta escisión directa de C3 puede iniciar la cascada del complemento, tal vez con la contribución de la vía alternativa (Matsushita y colaboradores, *J. Immunol* 165: 2637-2642 (2000)). Más tarde se demostró que la MASP-1 recombinante escinde la forma inactiva (tioéster hidrolizado) de C3 que es improductiva en términos de iniciar la cascada del complemento (Ambrus y colaboradores, *J. Immunol* 170: 1374-1382 (2003)). La falta de actividad de la vía de la lectina en las diluciones séricas de ratones con deficiencia de la MASP-2 demostró inequívocamente que el mecanismo de derivación de C3 dirigido por la MASP-1 no existe (Schwaeble y colaboradores, *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)). Los componentes del complemento que son escindidos por la MASP-1 con una eficiencia considerable son C2 (Rossi y col., *J Biol Chem* 276: 40880-40887 (2001); Ambrus y col., *J. Immunol* 170: 1374- 1382 (2003)) y la forma de zimógeno del factor D (Takahashi y col., *J Exp Med* 207: 29-37 (2010)). En cuanto a la capacidad de la MASP-1 para escindir C2, es plausible, por lo tanto, que la MASP-1 pueda aumentar la capacidad de formación de C3-convertasa (C4b2a) de la MASP-2 por escisión de C2. Esta sugerencia está respaldada por la observación de que la actividad de la vía de la lectina está disminuida en el suero humano empobrecido en MASP-1 y en el suero de ratones con deficiencia en MASP-1/3 (Takahashi y col., *J. Immunol* 180: 6132-6138 (2008)), observación esta que también sugiere que la MASP-1 cumple una función en la activación de la MASP-2. Además, aunque cada C4b depositada por el complejo MBL-MASP puede formar C4b2a convertasa, solo una de cada cuatro C4b depositadas por el complejo C1 de vía clásica puede hacer lo mismo (Rawal y colaboradores, *J Biol Chem* 283 (12): 7853-63 (2008)).

La MASP-1 también escinde la MASP-2 y MASP-3 (Megyeri M., y col., *J Biol Chem.* 2013 mar 29; 288 (13): 8922-34). Experimentos recientes sugieren que aunque la MASP-2 puede autoactivarse, la MASP-1 es el activador primario de la MASP-2 del zimógeno. La activación de la MASP-2 se retrasó en el suero de ratones knockout MASP-1 (Takahashi y col., *J. Immunol* 180: 6132-6138 (2008)) y se obtuvo un resultado similar cuando la actividad de la MASP-1 estuvo bloqueada por un inhibidor específico en suero humano normal (Kocsis y col., *J. Immunol* 185 (7): 4169-78 (2010)). Por otra parte, Degn y colaboradores (*J. Immunol.* 189 (8): 3957-69 (2012)) encontraron que la MASP-1 es crítica para la activación de la MASP-2 y la posterior escisión de C4 en suero humano. La velocidad catalítica para la conversión de la MASP-2 de zimógeno en MASP-2 activa es más de 85.000 veces mayor que la velocidad con la que la MASP-2 puede autoactivarse (Megyeri y col., *J Biol. Chem.* 288: 8922-8934 (2013); Héja y col., *J Biol. Chem.* 287 (24): 20290 - 300 (2012); Héja y colaboradores, *PNAS* 109: 10498 - 503 (2012)).

Descubrimientos recientes también han vinculado a la MASP-1 con la vía alternativa. La MASP-1 puede convertir el factor D del zimógeno en su forma enzimáticamente activa (Figura 39; Takahashi y col., *J Exp Med* 207: 29-37 (2010)). Además, la MASP-1 activa la forma de zimógeno de la MASP-3 (Megyeri y col., *J Biol. Chem.* 288: 8922-8934 (2013); Degn y col., *J. Immunol.* 189 (8): 3957-69 (2012)), que a su vez puede activar el factor D del zimógeno (figura 39), así como también dividir el factor B, otro componente esencial de la vía alternativa, en su forma activa (Iwaki y colaboradores, *J. Immunol.* 187: 3751-58 (2011)). La conversión de pro-factor D y del pro-factor B, sin embargo, es probable que sea independiente del estado de activación de LEA-2 y puede ocurrir a través de la MASP-1 no unida a un complejo.

Varias líneas de evidencia indican que la MASP-1 es una enzima similar a la trombina y que es importante en la activación de la vía de la coagulación. La MASP-1 puede escindir varios sustratos de trombina, que incluyen el fibrinógeno (Hajela K. y col., *Immunobiology* 205 (4-5): 467-75 (2002)), el factor XIII (Krarup y col., *Biochim Biophys Acta* 1784 (9): 1294 - 1300 (2008)) y el receptor 4 activado por proteasa (PAR4) (Megyeri y colaboradores, *J. Immunol* 183 (5): 3409 - 16 (2009)). Además, la antitrombina en presencia de heparina es un inhibidor más eficaz de la MASP-1 que el inhibidor de C1 (Dobó y col., *J Immunol* 183: 1207-1214 (2009)). La conexión entre el complemento y la vía de la coagulación también se subraya mediante la observación de que la MASP-2 puede activar la protrombina (Krarup A. y colaboradores, *PLoS One* 2 (7): e623 (2007)). La coagulación limitada representa

un tipo antiguo de inmunidad innata cuando el coágulo de fibrina previene la propagación de patógenos invasores. El fibrinopéptido B liberador tiene actividad proinflamatoria. La escisión mediada por la MASP-1 de PAR4 activa la reacción inflamatoria que inicia las células endoteliales (Megyeri y col., *J. Immunol* 183 (5): 3409-16 (2009)).

5 La MASP-3 no tiene actividad proteolítica hacia los sustratos C4, C2 o C3. Por el contrario, se informó que la MASP-3 actúa como un inhibidor de la vía de la lectina (Dahl y colaboradores, *Immunity* 15: 127-135 (2001)). Esta conclusión puede haberse producido porque, a diferencia de la MASP-1 y de la MASP-2, la MASP-3 no es una enzima de autoactivación (Zundel S. y col., *J. Immunol* 172: 4342-4350 (2004); Megyeri y colaboradores, *J Biol. Chem.* 288: 8922 - 8934 (2013)).

10 Recientemente, la evidencia de posibles funciones fisiológicas de la MASP-1 y de la MASP-3 surgió a partir de estudios en ratones transgénicos, utilizando una especie de ratón con una deficiencia combinada de la MASP-1 y de la MASP-3. Si bien los ratones MASP-1/3-knockout tienen una vía de la lectina funcional (Schwaeble y colaboradores, *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)), parecen carecer de actividad de la vía alternativa (Takahashi y colaboradores, *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). La falta de actividad de la vía alternativa parece deberse a un defecto de procesamiento del factor D del complemento, que es necesario para la actividad de la vía alternativa. En los ratones knockout MASP-1/3, todo el factor D circula como una pro-forma proteolíticamente inactiva, mientras que en el suero de ratones normales, sustancialmente todo el factor D está en forma activa. El análisis bioquímico sugirió que la MASP-1 puede ser capaz de convertir el factor D del complemento desde su forma de zimógeno a su forma enzimáticamente activa (Figura 39; Takahashi y col., *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). La MASP-3 también escinde el zimógeno del pro-factor D y produce el factor D activo *in vitro* (Figura 39; Takahashi y col., *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). El factor D está presente como una enzima activa en la circulación en individuos normales, y la MASP-1 y la MASP-3, así como la HTRA-1, pueden ser responsables de esta activación. Además, los ratones con deficiencias combinadas de MBL y ficolina aún producen niveles normales de factor D y tienen una vía alternativa completamente funcional. Por lo tanto, estas funciones fisiológicas de la MASP-1 y de la MASP-3 no implican necesariamente lectinas, y por lo tanto no están relacionadas con la vía de la lectina. La MASP-3 recombinante de ratón y humano también parece escindir el factor B y apoyar el depósito de C3 en el *S. aureus in vitro* (figura 36, Iwaki D. y col., *J. Immunol* 187 (7): 3751-8 (2011)).

Un papel fisiológico inesperado para MASP-3 ha surgido a partir de estudios recientes de pacientes con síndrome de 3MC (anteriormente denominado síndrome de Carnevale, Mingarelli, Malpuech y Michels; OMIM n.º 257920). Estos pacientes presentan anomalías graves del desarrollo, como paladar hendido, labio leporino, malformaciones craneales y retraso mental. El análisis genético identificó pacientes con 3MC que eran homocigóticos para un gen disfuncional de la MASP-3 (Rooryck y colaboradores, *Nat Genet.* 43 (3): 197-203 (2011)). Se encontró que otro grupo de pacientes con 3MC era homocigótico para una mutación en el gen de la MASP-1 que conduce a la ausencia de proteínas funcionales de la MASP-1 y la MASP-3. Sin embargo, otro grupo de pacientes con 3MC carecía de un gen CL-11 funcional. (Rooryck y col., *Nat Genet.* 43 (3): 197 - 203 (2011)). Por lo tanto, el eje CL-11 MASP-3 parece jugar un papel durante el desarrollo embrionario. Los mecanismos moleculares de esta vía de desarrollo no están claros. Sin embargo, es poco probable que estén mediados por un proceso convencional impulsado por el complemento, ya que los individuos con deficiencias de los componentes C3 comunes del complemento no desarrollan este síndrome. Por lo tanto, antes del descubrimiento de los presentes inventores, como se describe en este documento, no se había establecido un papel funcional para MASP-3 en la activación del complemento dependiente de la lectina.

Las estructuras del fragmento catalítico de la MASP-1 y de la MASP-2 se han determinado mediante cristalografía de rayos X. La comparación estructural del dominio de proteasa de la MASP-1 con los de otras proteasas del complemento reveló la base de su especificidad de sustrato relajado (Dobó y col., *J. Immunol* 183: 1207-1214 (2009)). Aunque la accesibilidad del surco de unión al sustrato de la MASP-2 está restringida por bucles superficiales (Harmat y colaboradores, *J Mol Biol* 342: 1533-1546 (2004)), la MASP-1 tiene un bolsillo de unión al sustrato abierto que se parece al de tripsina en lugar de otras proteasas del complemento. Una propiedad similar a la trombina de la estructura de la MASP-1 es el bucle de 60 aminoácidos inusualmente grande (bucle B) que puede interactuar con los sustratos. Otra característica interesante de la estructura MASP-1 es el puente salino interno entre el S1 Asp189 y el Arg224. Se puede encontrar un puente de sal similar en el bolsillo de unión al sustrato del factor D, que puede regular su actividad de proteasa. C1s y MASP-2 tienen especificidades de sustrato casi idénticas. Sorprendentemente, algunos de los ocho bucles de superficie de la MASP-2, que determinan las especificidades del sustrato, tienen conformaciones bastante diferentes en comparación con los de C1s. Esto significa que las dos enzimas relacionadas funcionalmente interactúan con los mismos sustratos de una manera diferente. La estructura de la MASP-2 del zimógeno muestra un dominio de proteasa inactivo con un agujero de oxianión alterado y un bolsillo de unión al sustrato (Gál y col., *J Biol Chem* 280: 33435-33444 (2005)). Sorprendentemente, la MASP-2 del zimógeno muestra una actividad considerable en un sustrato de proteína grande, C4. Es probable que la estructura de la MASP-2 del zimógeno sea bastante flexible, permitiendo la transición entre las formas inactiva y activa. Esta flexibilidad, que se refleja en la estructura, puede desempeñar un papel en el proceso de autoactivación.

El análisis de transferencia Northern indica que el hígado es la principal fuente de ARNm de la MASP-1 y de la MASP-2. Utilizando una sonda de ADNc 5' específica para MASP-1, se observó un transcrito principal de la MASP-1 a 4,8 kb y uno menor, a 3,4 kb aproximadamente, ambos presentes en el hígado humano y de ratón (Stover y

colaboradores, *Genes Immunity* 4: 374- 84 (2003)). El ARNm de la MASP-2 (2,6 kb) y el ARNm de la MASP-1 (1,0 kb) se expresan abundantemente en el tejido hepático. La MASP-3 se expresa en el hígado, y también en muchos otros tejidos, incluido el tejido neuronal (Lynch N. J. y col., *J. Immunol* 174: 4998-5006 (2005)).

5 Se descubrió que un paciente con antecedentes de infecciones y enfermedad inflamatoria crónica tenía una forma mutada de la MASP-2, que no forma un complejo activo de MBL-MASP (Stengaard-Pedersen y col., *N Engl J Med* 349: 554 - 560 (2003)). Algunos investigadores han determinado que la deficiencia en MBL conduce a una tendencia a infecciones frecuentes en la infancia (Super y colaboradores, *Lancet* 2: 1236-1239 (1989), Garred y colaboradores, *Lancet* 346: 941-943 (1995) y una menor resistencia a la infección por VIH (Nielsen y colaboradores, *Clin Exp Immunol* 100: 219 - 222 (1995); Garred y colaboradores, *Mol Immunol* 33 (suppl 1): 8 (1996)). Sin embargo, otros estudios no han demostrado una significativa correlación de niveles bajos de MBL con infecciones incrementadas (Egli y colaboradores, *PLoS One* 8 (1): e51983 (2013); Ruskamp y col., *J Infect Dis* 198 (11): 1707-13 (2008); Israëls y colaboradores al., *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 95 (6): F452-61 (2010)). Si bien la bibliografía es mixta, la deficiencia o la no utilización de la MASP puede tener un efecto adverso en la capacidad de un individuo para establecer una defensa inmediata, no dependiente de los anticuerpos contra ciertos patógenos.

15 iii. Datos que respaldan el nuevo concepto, subrayando las condiciones de ensayo tradicionales que están desprovistos de  $Ca^{++}$  y los resultados obtenidos usando un conjunto más fisiológico de condiciones que incluyen  $Ca^{++}$ .

20 Varias líneas independientes de pruebas experimentales sólidas proporcionan aquí la conclusión de que el camino de activación de la vía de la lectina del complemento activa el complemento a través de dos mecanismos efectores independientes: i) LEA-2: una vía impulsada por la MASP-2 que media la opsonización impulsada por el complemento, la quimiotaxis (Schwaebler y col., *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)) y la lisis celular, y ii) LEA-1: una nueva vía de activación dependiente de la MASP-3 que inicia la activación del complemento al generar la convertasa C3bBb de la vía alternativa, a través de escisión y activación del factor B en las superficies del activador, que luego catalizarán el depósito de C3b y la formación de la convertasa C3bBb alternativa de la vía alternativa, que puede dar como resultado la lisis celular así como la opsonización microbiana. Además, como se describe en el presente documento, la activación independiente de la lectina del factor B y/o del factor D por la MASP-1, la MASP-3 o la HTRA-1, o una combinación de cualquiera de los tres, también puede conducir a la activación del complemento a través del vía alternativa.

30 Una activación de la vía alternativa impulsada por la MASP-3 dependiente de la vía de la lectina parece contribuir a la división bien establecida mediada por el factor D del factor unido a C3b para lograr tasas de activación óptimas para la lisis dependiente del complemento, a través de la cascada de activación terminal, para lisar células bacterianas mediante la formación de complejos de ataque a la membrana C5b-9 (MAC) en la superficie celular (figuras 14-15). Este evento de tasa limitada parece requerir una coordinación óptima, ya que es defectuoso en ausencia de actividad funcional MASP-3, así como en ausencia de actividad funcional del factor D. Como se describe en los ejemplos 1-4 de esta memoria, los inventores descubrieron esta función de la vía de la lectina dependiente de la MASP-3 cuando se estudió el fenotipo de deficiencia de la MASP-2 y la inhibición de la MASP-2 en modelos experimentales de ratón de infección por *N. meningitidis*. Los ratones dirigidos a genes, con deficiencia en MASP-2 y los ratones de tipo salvaje tratados con inhibidores de la MASP-2 basados en anticuerpos eran altamente resistentes a la infección experimental por *N. meningitidis* (ver las figuras 8-12). Cuando la dosis infecciosa se ajustó para obtener aproximadamente un 60 % de mortalidad en los compañeros de camada de tipo salvaje, todos los ratones con deficiencia de la MASP-2 o MASP-2 combatieron la infección y sobrevivieron (véanse la figura 8 y la figura 12). Este grado extremadamente alto de resistencia se reflejó en un aumento significativo de la actividad bactericida sérica en suero de ratón con deficiencia de MASP-2 o reducción de MASP-2. Experimentos adicionales mostraron que esta actividad bactericida dependía de la lisis bacteriana inducida por la vía alternativa. Los sueros de ratones con deficiencia del factor B o del factor D o de C3 no mostraron actividad bactericida frente a *N. meningitidis*, lo que indica que la vía alternativa es esencial para dirigir la cascada de activación terminal. Un resultado sorprendente fue que los sueros de ratón con deficiencias de MBL-A y MBL-C (ambas moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina que reconocen al *N. meningitidis*), así como los sueros de ratón con deficiencia en las serina proteasas MASP-1 y MASP-3 asociadas con la vía de la lectina, habían perdido toda la actividad bacteriolítica hacia *N. meningitidis* (figura 15). Un documento reciente (Takahashi M. y colaboradores, *JEM* 207: 29-37 (2010)) y el trabajo presentado en este documento (figura 39) demuestran que la MASP-1 puede convertir la forma de zimógeno del factor D en su forma enzimáticamente activa y puede explicar en parte la pérdida de actividad lítica a través de la ausencia del factor D enzimáticamente activo en estos sueros. Esto no explica la falta de actividad bactericida en ratones con deficiencia en MBL ya que estos ratones tienen factor D enzimáticamente activo normal (Banda y colaboradores, *Mol. Immunol* 49 (1-2): 281-9 (2011)). Sorprendentemente, cuando se prueban sueros humanos de pacientes con el raro trastorno autosómico recesivo 3MC (Rooryck C, y colaboradores, *Nat Genet*. 43 (3): 197-203) con mutaciones que vuelven disfuncional el dominio de serina proteasa de la MASP-3, no se detectó actividad bactericida contra *N. meningitidis*, (nota importante: estos sueros tienen MASP-1 y factor D, pero no MASP-3).

60 La hipótesis de que el suero humano requiere actividad dependiente de la MASP-3 mediada por la vía de la lectina para desarrollar actividad bactericida está respaldada, además, por la observación de que los sueros humanos con deficiencia en MBL tampoco pueden lisar *N. meningitidis* (figuras 13-14). La MBL es la única molécula humana de

reconocimiento de la vía de la lectina que se une a este patógeno. Como la MASP-3 no se autoactiva, los inventores plantean la hipótesis de que la mayor actividad bacteriolítica en sueros con deficiencia en MASP-2 podría explicarse por una activación favorecida de la MASP-3, a través de la MASP-1 ya que, en ausencia de la MASP-2, todos los complejos de activación por la vía de la lectina que se unen a la superficie bacteriana se cargarán con cualquiera MASP-1 o MASP-3. Dado que la MASP-3 activado escinde tanto el factor D (figura 39) como el factor B para generar sus respectivas formas enzimáticamente activas *in vitro* (figura 37 e Iwaki D., y col., *J. Immunol.* 187 (7): 3751-3758 (2011)), la función más probable de la MASP-3 es facilitar la formación de la C3 convertasa de la vía alternativa (es decir, C3bBb).

Si bien los datos para el papel dependiente de la lectina son convincentes, múltiples experimentos sugieren que la MASP-3 y MASP-1 no están necesariamente obligadas a funcionar en un complejo con moléculas de lectina. Experimentos tales como el mostrado en la figura 35B demuestran la capacidad de la MASP-3 para activar la vía alternativa (como se demostró mediante el depósito de C3b sobre *S. aureus*), en condiciones (es decir, la presencia de EGTA) en las que los complejos con lectina no estarían presentes. La figura 35A demuestra que el depósito en estas condiciones depende del factor B, del factor D y del factor P, todos componentes críticos de la vía alternativa. Adicionalmente, la activación del factor D por la MASP-3 y MASP-1 (figura 39), y la activación del factor B por la MASP-3 (figura 37) pueden ocurrir *in vitro* en ausencia de lectina. Finalmente, los estudios de hemólisis de eritrocitos de ratón en presencia de suero humano demuestran un papel claro tanto para MBL como para MASP-3 para la lisis celular. Sin embargo, la deficiencia en MBL no reproduce completamente la gravedad de la deficiencia de la MASP-3, en contraste con lo que se esperaría si todas las MASP-3 funcionales formaran complejo con MBL. Por lo tanto, los inventores no desean verse limitados por la noción de que todas las funciones para la MASP-3 (y la MASP-1) demostradas en la presente pueden atribuirse únicamente a la función asociada con la lectina.

La identificación de los dos brazos efectores de la vía de la lectina, así como las posibles funciones independientes de lectina de la MASP-1, MASP-3 y HTRA-1, representan oportunidades novedosas de intervenciones terapéuticas para tratar eficazmente patologías humanas definidas causadas por un exceso de activación del complemento, en presencia de patógenos microbianos o células hospedadoras alteradas o depósitos metabólicos. Como se describe en este documento, los inventores ahora han descubierto que, en ausencia de la MASP-3 y en presencia de la MASP-1, la vía alternativa no se activa en las estructuras superficiales (véanse las figuras 17-18, 35B, 41-42, 45-46). Como la vía alternativa es importante para impulsar los eventos limitantes de la velocidad que conducen a la lisis bacteriana así como a la lisis celular (Mathieson PW, y col., *JExp Med* 177 (6): 1827-3 (1993)), nuestros resultados demuestran que la activación MASP-3 juega un papel importante en la actividad lítica del complemento. Como se muestra en las figuras 14-15, 21-23, 43-44 y 46-47, en el suero de pacientes con 3MC que carecen de la MASP-3 pero no de la MASP-1, la cascada de activación terminal lítica del complemento es defectuosa. Los datos mostrados en las figuras 14 y 15 demuestran una pérdida de actividad bacteriolítica en ausencia de actividad funcional de MASP-3 y/o MASP-1/MASP-3. Asimismo, la pérdida de actividad hemolítica en suero humano con deficiencia en MASP-3 (figuras 21-23, 43-44 y 46-47), junto con la capacidad de reconstituir la hemólisis mediante la adición de la MASP-3 recombinante (figuras 46-47), apoya firmemente la conclusión de que la activación de la vía alternativa en las superficies diana (que es esencial para conducir la lisis mediada por el complemento) depende de la presencia de la MASP-3 activada. Con base en el nuevo concepto de la vía de la lectina detallado anteriormente, la activación de la vía alternativa de las superficies diana depende así de LEA-1 y/o la activación independiente de la lectina del factor B y/o del factor D, que también está mediada por la MASP-3 y, por lo tanto, los agentes que bloquean la activación del complemento dependiente de la MASP-3 evitarán la activación de la vía alternativa en las superficies diana.

La descripción del papel esencial del inicio dependiente de la MASP-3 de la activación de la vía alternativa implica que la vía alternativa no es una vía independiente y autónoma de activación del complemento, como se describe esencialmente en todos los libros de texto médicos actuales y artículos de revisión recientes sobre el complemento. La opinión científica actual y ampliamente aceptada es que la vía alternativa se activa en la superficie de ciertos blancos particulados (microbios, zimosano y eritrocitos de conejo), a través de la amplificación de la activación espontánea de C3 "tic-over". Sin embargo, la ausencia de toda activación de la vía alternativa en sueros de ratones con doble deficiencia MASP-1 y MASP-3 y en el suero de pacientes humanos con 3MC en placas recubiertas con zimosano y dos bacterias diferentes (*N. meningitidis* y *S. aureus*), y la reducción de hemólisis de eritrocitos en sueros con deficiencia en MASP-3 de humanos y ratones indican que la iniciación de la activación de la vía alternativa en estas superficies requiere de la MASP-3 funcional. El papel requerido para la MASP-3 puede ser dependiente de la lectina o independiente de ella, y conduce a la formación de complejos de C3 convertasa y C5 convertasa, es decir, C3bBb y C3bBb(C3b)<sub>n</sub>, respectivamente. Por lo tanto, los inventores aquí describen la existencia de vías de iniciación previamente elusivas para la vía alternativa. Esta vía de iniciación depende: (i) del LEA-1, un brazo de activación recién descubierto de la vía de la lectina, y/o (ii) de las funciones independientes de la lectina de las proteínas MASP-3, MASP-1 y HTRA-1.

III. El papel de la MASP-2 y de la MASP-3 en la hemoglobinuria nocturna paroxísmica y métodos terapéuticos usando agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3

i. Descripción de la HPN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), también conocida como síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad de la sangre adquirida y potencialmente mortal. La HPN puede desarrollarse por sí misma, conocida como "HPN primaria", o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, como la anemia aplásica, conocida como "HPN secundaria". La mayoría de los casos son HPN primaria. La HPN se caracteriza por la destrucción de los glóbulos rojos (hemólisis) inducida por el complemento, por bajos recuentos de glóbulos rojos (anemia), trombosis y falla de la médula ósea. Los hallazgos de laboratorio en la HPN muestran cambios consistentes con la anemia hemolítica intravascular: baja concentración de hemoglobina, lactatodeshidrogenasa elevada, recuento elevado de reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros liberados por la médula ósea para reemplazar las células destruidas), aumento de la bilirrubina (un producto de degradación de la hemoglobina), en ausencia de anticuerpos de unión a RBC [*red blood cells*, glóbulos rojos] autorreactivos como una posible causa.

El sello distintivo de la HPN es la hemólisis crónica mediada por el complemento, causada por la activación no regulada de los componentes terminales del complemento, incluido el complejo de ataque a la membrana, en la superficie de los glóbulos rojos circulantes. Los RBC de HPN están sujetos a la activación incontrolada del complemento y la hemólisis debido a la ausencia de los reguladores del complemento CD55 y CD59 en su superficie (Lindorfer, MA, y col., *Blood* 115 (11): 2283-91 (2010), Risitano, y colaboradores, *Mini-Reviews en Medicinal Chemistry*, 11: 528-535 (2011)). Los CD55 y CD59 se expresan abundantemente en los RBC normales y controlan la activación del complemento. CD55 actúa como un regulador negativo de la vía alternativa, inhibiendo el ensamblaje del complejo de la C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb) y acelerando la descomposición de la convertasa preformada, bloqueando así la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El CD59 inhibe directamente el complejo de ataque a la membrana del complemento uniendo el complejo C5b678 e impidiendo que C9 se una y polimerice.

Si bien la hemólisis y la anemia son las características clínicas dominantes de la HPN, la enfermedad es un trastorno hematológico complejo, que incluye, además, trombosis e insuficiencia de la médula ósea como parte de los hallazgos clínicos (Risitano et al, *Mini Reviews en Med Chem* 11: 528-535 (2011)). A nivel molecular, la HPN es causada por la expansión clonal anormal de células madre hematopoyéticas que carecen de un gen PIG A funcional. El PIG A es un gen ligado a X que codifica una glucosil-fosfatidil inositol transferasa requerida para la expresión estable en la superficie de glucoproteínas de clase A ancladas a GPI, incluso CD55 y CD59. Por razones que están actualmente bajo investigación, las células madre hematopoyéticas con un gen PIG A disfuncional que surgen como resultado de mutaciones somáticas espontáneas pueden experimentar una expansión clonal hasta el punto donde su progenie constituye una porción significativa del conjunto de células hematopoyéticas periféricas. Si bien la progenie de los eritrocitos y los linfocitos del clon de células madre mutantes carecen de CD55 y CD59, solo los RBC se someten a una lisis evidente después de que ingresan a la circulación.

El tratamiento actual para la HPN incluye transfusión de sangre para la anemia, anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege las células sanguíneas contra la inmunodestrucción, al inhibir el sistema del complemento (Hillmen P. y colaboradores, *N Engl. J Med.* 350 (6): 552 - 559 (2004)). El eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al componente C5 del complemento, bloqueando su escisión por las C5 convertasas, evitando así la producción de C5a y el ensamblaje de MAC. El tratamiento con eculizumab en pacientes con HPN ha resultado en una reducción de la hemólisis intravascular, según se mide por la lactato-deshidrogenasa (LDH), que conduce a la estabilización de la hemoglobina y la independencia de la transfusión en aproximadamente la mitad de los pacientes (Risitano et al, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(6) (2011)). Si bien casi todos los pacientes sometidos a terapia con eculizumab alcanzan niveles normales o casi normales de LDH (debido al control de la hemólisis intravascular), solo aproximadamente un tercio de los pacientes alcanzan un valor de hemoglobina de aproximadamente 11 g/dl y los pacientes restantes con eculizumab continúan exhibiendo una anemia moderada a grave (es decir, dependiente de transfusiones), en proporciones aproximadamente iguales (Risitano AM y colaboradores, *Blood* 113: 4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano y colaboradores, *Mini Reviews en Medicinal Chemistry* 11: 528-535 (2011), se demostró que los pacientes con HPN tratados con eculizumab contenían grandes cantidades de fragmentos de C3 unidos a sus eritrocitos de HPN (mientras que los pacientes no tratados no los tenían). Este hallazgo condujo al reconocimiento de que en pacientes con HPN tratados con Soliris, los RBH de la HPN que ya no son hemolizados debido al bloqueo de C5 ahora pueden acumular cantidades copiosas de fragmentos de C3 unidos a la membrana, que funcionan como opsoninas, lo cual da como resultado que queden atrapados en las células reticuloendoteliales a través de receptores de C3 específicos y de la hemólisis extravascular posterior. Por lo tanto, mientras se previene la hemólisis intravascular y las secuelas resultantes, la terapia con eculizumab simplemente desvía la disposición de estos RBC de la hemólisis intravascular a la extravascular, lo cual deriva en una anemia residual no tratada sustancial en muchos pacientes (Risitano AM y colaboradores, *Blood* 113: 4094-100 (2009)). Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas además del uso de eculizumab para aquellos pacientes que desarrollan hemólisis extravascular mediada por fragmentos de C3, porque continúan requiriendo transfusiones de glóbulos rojos. Tales enfoques de direccionamiento de fragmentos de C3 han demostrado utilidad en sistemas experimentales (Lindorfer y colaboradores, *Blood* 115: 2283-91, 2010).

ii. Mecanismos de inicio del complemento en la HPN

La relación causal entre la expresión defectuosa en la superficie de los reguladores negativos del complemento CD55 y CD59 en la HPN, combinada con la efectividad del eculizumab para prevenir la hemólisis intravascular, define claramente a la HPN como una afección mediada por el sistema del complemento. Si bien este paradigma es ampliamente aceptado, la naturaleza de los eventos que inician la activación del complemento y la o las vías de activación del complemento involucradas permanecen sin resolver. Debido a que CD55 y CD59 regulan negativamente los pasos de amplificación terminales en la cascada del complemento común a todas las vías de inicio del complemento, la deficiencia de estas moléculas conducirá a una formación exagerada e integración de la membrana de los complejos de ataque a la membrana, independientemente de si la activación del complemento se inicia por la vía de la lectina, por la vía clásica o por el giro espontáneo de la vía alternativa. Por lo tanto, en pacientes con HPN, cualquier evento de activación del complemento que conduzca al depósito de C3b en la superficie de los RBC puede desencadenar una posterior amplificación y hemólisis patológica (intravascular y/o extravascular) y precipitar una crisis hemolítica. La clara comprensión mecanística de los eventos moleculares que desencadenan la crisis hemolítica en pacientes con HPN ha permanecido difusa. Debido a que ningún evento iniciador del complemento es manifiestamente evidente en pacientes con HPN que sufren una crisis hemolítica, la opinión predominante es que la activación del complemento en la HPN puede ocurrir espontáneamente debido a la al bajo nivel "tick-over" de activación de la vía alternativa, que posteriormente se magnifica por el control inapropiado de la activación del complemento terminal debido a la falta de CD55 y CD59.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que en su historia natural, la HPN generalmente se desarrolla o se exagera después de ciertos eventos, como una infección o una lesión (Risitano, *Biologics* 2:205-222 (2008)), que se ha demostrado que desencadenan la activación del complemento. Esta respuesta de activación del complemento no depende de la inmunidad previa del hospedador hacia el patógeno incitador y, por lo tanto, probablemente no involucre la vía clásica. Por el contrario, parece que esta respuesta de activación del complemento se inicia mediante la unión de lectina a patrones de carbohidratos extraños o "autoalterados" expresados en la superficie de agentes microbianos o tejidos dañados del hospedador, por lo que los eventos que precipitan la crisis hemolítica en la HPN están estrechamente relacionados con la activación del complemento iniciado a través de lectinas. Esto hace que sea muy probable que las vías de activación de la lectina proporcionen el desencadenante iniciador que finalmente conduce a la hemólisis en pacientes con HPN.

Usando patógenos bien definidos que activan el complemento a través de lectinas como modelos experimentales para diseccionar las cascadas de activación a nivel molecular, demostramos que, dependiendo del microbio incitador, la activación del complemento puede ser iniciada por LEA-2 o LEA-1, lo que lleva a la opsonización y/o lisis. Este mismo principio de respuestas duales (es decir, opsonización y/o lisis) para eventos de iniciación de lectina probablemente también se aplicará a otros tipos de agentes infecciosos, o a la activación del complemento por las lectinas después del daño tisular al hospedador, u otros eventos de activación del complemento impulsados por la lectina que pueden precipitar la HPN. Sobre la base de esta dualidad en la vía de la lectina, inferimos que la activación del complemento iniciada por LEA-2 y/o LEA-1 en pacientes con HPN promueve la opsonización y/o lisis de los glóbulos rojos con C3b y la posterior hemólisis extravascular e intravascular. Por lo tanto, en el contexto de la HPN, se esperaría que la inhibición tanto de LEA-1 como de LEA-2 aborde tanto la hemólisis intravascular como la extravascular, proporcionando una ventaja significativa sobre el inhibidor de C5, eculizumab.

Se ha determinado que la exposición al *S. pneumoniae* desencadena preferentemente la activación dependiente de la lectina de LEA-2, que conduce a la opsonización de este microbio con C3b. Dado que el *S. pneumoniae* es resistente a la lisis mediada por MAC, su eliminación de la circulación se produce mediante la opsonización con C3b. Esta opsonización y posterior eliminación de la circulación depende de LEA-2, como lo indica el control bacteriano comprometido en ratones con deficiencia de la MASP-2 y en ratones tratados con anticuerpos monoclonales de la MASP-2 (PLOS Pathog., 8: e1002793 (2012)).

Al explorar el papel de LEA-2 en las respuestas del hospedador innato a agentes microbianos, probamos patógenos adicionales. Se observó un resultado dramáticamente diferente cuando se estudió el *Neisseria meningitidis* como un organismo modelo. El *N. meningitidis* también activa el complemento a través de lectinas, y se requiere la activación del complemento para la contención de las infecciones por *N. meningitidis* en el hospedador no tratado previamente. Sin embargo, el LEA-2 no desempeña un papel funcional protector del hospedador en esta respuesta: como se muestra en las figuras 8 y 9, el bloqueo de LEA-2 a través de la ablación genética de la MASP-2 no reduce la supervivencia después de la infección con *N. meningitidis*. Por el contrario, el bloqueo de LEA-2 mediante ablación de la MASP-2 mejoró significativamente la supervivencia (figuras 8 y 9) y los puntajes de la enfermedad (figura 11) en estos estudios. El bloqueo de LEA-2 mediante la administración del anticuerpo de la MASP-2 produjo el mismo resultado (figura 12), eliminando los efectos secundarios o compensatorios en la especie de ratón *knock-out* como una posible causa. Estos resultados favorables en animales con ablación de LEA-2 se asociaron con una eliminación más rápida de *N. meningitidis* de la sangre (figura 10). Además, como se describe en la presente memoria descriptiva, la incubación de *N. meningitidis* con suero humano normal mató al *N. meningitidis* (figura 13). La adición de un anticuerpo monoclonal funcional específico para la MASP-2 humana que bloquea al LEA-2, pero no la administración de un anticuerpo monoclonal de control de isotipo, puede potenciar esta respuesta de exterminio. Sin embargo, este proceso depende de lectinas y de un sistema de complemento al menos parcialmente funcional, ya que el suero humano con deficiencia en MBL o el suero humano inactivado por calor no fue capaz de matar *N. meningitidis* (figura 13). Colectivamente, estos nuevos hallazgos sugieren que las infecciones por *N. meningitidis* en

presencia de un sistema de complemento funcional se controlan por una vía de activación del complemento dependiente de la lectina pero independiente de LEA-2.

La hipótesis de que LEA-1 puede ser la vía del complemento responsable de la muerte dependiente de la lectina de *N. meningitidis* se probó usando una muestra de suero de un paciente con 3MC. Este paciente era homocigoto para una mutación sin sentido en el exón 12 del gen MASP-1/3. Como resultado, este paciente carecía de una proteína de la MASP-3 funcional, pero por lo demás, tenía suficiencia de complemento (el exón 12 es específico para el transcrito de la MASP-3; la mutación no tiene efecto en la función o en los niveles de expresión de la MASP-1) (ver *Nat Genet* 43). (3): 197-203 (2011)). El suero humano normal mata eficientemente al *N. meningitidis*, pero el suero inactivado por calor con deficiencia en MBL (una de las moléculas de reconocimiento para la vía de la lectina) y el suero con deficiencia en MASP-3 no pudieron matar a *N. meningitidis* (figura 14). Por lo tanto, el LEA-1 parece mediar la muerte de *N. meningitidis*. Este hallazgo se confirmó usando muestras de suero de especies de ratones *knockout*. Mientras que el suero de ratón normal que contiene el destruye fácilmente al *N. meningitidis*, el suero de ratón con deficiencia en MBL o con deficiencia en MASP-1/3 fue tan ineficaz como el suero inactivado por calor que carece de complemento funcional (figura 15). Por el contrario, el suero con deficiencia en MASP-2 exhibió un exterminio eficiente de *N. meningitidis*.

Estos hallazgos proporcionan evidencia de una dualidad hasta ahora desconocida en la vía de la lectina al revelar la existencia de vías separadas de LEA-2 y LEA-1 de activación del complemento dependiente de la lectina. En los ejemplos detallados anteriormente, LEA-2 y LEA-1 no son redundantes y median resultados funcionales distintos. Los datos sugieren que ciertos tipos de activadores de la vía de la lectina (que incluyen pero no se limitan al *S. pneumonia*) inician preferentemente la activación del complemento a través de LEA-2, lo que conduce a la opsonización, mientras que otros (ejemplificados por *N. meningitidis*) inician preferentemente la activación del complemento a través de LEA-1 y promueven procesos citolíticos. Los datos, sin embargo, no necesariamente limitan al LEA-2 a la opsonización y al LEA-1 a los procesos citolíticos, ya que ambas vías en otros entornos pueden mediar la opsonización y/o la lisis.

En el contexto de la activación del complemento dependiente de la lectina por *N. meningitidis*, las ramas del LEA-2 y LEA-1 parecen competir entre sí, ya que el bloqueo de LEA-2 intensifica la destrucción lítica dependiente de LEA-1 del organismo *in vitro* (figura 15). Como se detalló anteriormente, este hallazgo puede explicarse por la mayor probabilidad de que los complejos de la MASP-1 de la lectina que residen en las proximidades de los complejos de la MASP-3 de la lectina en ausencia de la MASP-2, mejorarán la activación de LEA-1 y promoverán una lisis más efectiva del *N. meningitidis*. Debido a que la lisis de *N. meningitidis* es el principal mecanismo de protección en el hospedador naïve, el bloqueo del LEA-2 *in vivo* aumenta la depuración del *N. meningitidis* y conduce a un mejor exterminio.

Si bien los ejemplos discutidos anteriormente ilustran efectos opuestos de LEA-2 y LEA-1 con respecto a los resultados después de la infección con *N. meningitidis*, puede haber otros entornos donde tanto LEA-2 como LEA-1 pueden sinergizarse para producir un determinado resultado. Como se detalla a continuación, en otras situaciones de activación patológica del complemento mediante las lectinas, tales como las presentes en HPN, la activación del complemento inducida por LEA-2 y LEA-1 puede cooperar de forma sinérgica para contribuir a la patología global de la HPN. Además, como se describe en este documento, la MASP-3 también contribuye a la conversión independiente de la lectina del factor B y del factor D, que puede ocurrir en ausencia de  $Ca^{++}$ , lo cual conduce comúnmente a la conversión de C3bB en C3bBb y del pro-factor D al factor D, que puede contribuir aún más a la patología de la HPN.

### iii. Biología y actividad funcional esperada en HPN

Esta sección describe los efectos inhibidores del bloqueo de LEA-2 y LEA-1 sobre la hemólisis en un modelo *in vitro* de la HPN. Los hallazgos respaldan la utilidad de los agentes bloqueadores de LEA-2 (que incluyen, entre otros, anticuerpos que se unen y bloquean la función de la MASP-2) y agentes bloqueadores de LEA-1 (incluidos, entre otros, anticuerpos que se unen a la función de la activación de la MASP-3, MASP-3 o ambas mediadas por la MASP-1 y la bloquean) para tratar sujetos que padecen uno o más aspectos de la HPN, y también el uso de inhibidores de la activación del complemento de LEA-2 y/o LEA-1 y/o dependiente de la MASP-3, independiente de la lectina (incluidos los inhibidores de la MASP-2, inhibidores de la MASP-3 e inhibidores de MASP-2/MASP-3 duales o biespecíficos o inhibidores de la MASP-1/MASP-2, e inhibidores de la MASP-1/MASP-2/MASP-3 pan-específicos) para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por fragmentos C3 en pacientes con HPN sometidos a terapia con un inhibidor de C5 tal como eculizumab.

### iv. Inhibidores de la MASP-2 para bloquear la opsonización y la hemólisis extravascular de los RBC de la HPN a través del sistema reticuloendotelial

Como se ha detallado anteriormente, los pacientes con HPN se vuelven anémicos debido a dos mecanismos distintos de depuración de los RBC de la circulación: hemólisis intravascular por activación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y hemólisis extravascular después de la opsonización con C3b y la depuración posterior después de la unión del receptor del complemento y la captación por el sistema reticuloendotelial. La hemólisis

intravascular se previene en gran medida cuando un paciente es tratado con eculizumab. Debido a que eculizumab bloquea el mecanismo efector lítico terminal que ocurre después tanto del evento de activación que inicia el complemento como de la opsonización subsiguiente, eculizumab no bloquea la hemólisis extravascular (Risitano A.M. y colaboradores, *Blood* 113: 4094-100 (2009)). En cambio, los glóbulos rojos que se habrían sometido a hemólisis en pacientes con HPN no tratados ahora pueden acumular proteínas C3b activadas en su superficie, lo que aumenta la captación por el sistema reticuloendotelial y mejora su hemólisis extravascular. Por lo tanto, el tratamiento con eculizumab desvía de manera efectiva la disposición de los RBC de la hemólisis intravascular a una posible hemólisis extravascular. Como resultado, algunos pacientes con HPN tratados con eculizumab permanecen anémicos. De ello se desprende que los agentes que bloquean la activación del complemento corriente arriba y evitan la opsonización de los RBC de la HPN pueden ser particularmente adecuados para bloquear la hemólisis extravascular ocasionalmente observada con eculizumab.

Los datos microbianos presentados aquí sugieren que el LEA-2 es a menudo la vía dominante para la opsonización dependiente de la lectina. Además, cuando se evaluó la opsonización dependiente de la lectina (medida como depósito de C3b) en tres superficies de activación de lectina prototípicas (manano, figura 19A; zimosano, figura 19B y *S. pneumoniae*; figura 19C), el LEA-2 parece ser la vía dominante para la opsonización dependiente de la lectina en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de  $Ca^{++}$  en el que todas las vías del complemento son operativas). En estas condiciones experimentales, el suero con deficiencia en MASP-2 (que carece de LEA-2) es sustancialmente menos eficaz en la opsonización de las superficies de prueba que el suero de WT. El suero con deficiencia de la MASP-1/3 (que carece de LEA-1) también está comprometido, aunque este efecto es mucho menos pronunciado en comparación con el suero que carece de LEA-2. La magnitud relativa de las contribuciones de LEA-2 y LEA-1 a la opsonización impulsada por lectina se ilustra adicionalmente en las figuras 20A-20C. Aunque se ha informado que la vía alternativa del complemento apoya la opsonización de las superficies activadoras de lectina en ausencia de la vía de la lectina o la vía clásica (Selander y colaboradores, *J Clin Invest* 116 (5): 1425-1434 (2006)), la vía alternativa en el aislamiento (medida en condiciones de ensayo libres de  $Ca^{++}$ ) parece sustancialmente menos efectiva que los procesos iniciados pro LEA-2 y LEA-1 descritos en este documento. Por extrapolación, estos datos sugieren que la opsonización de los RBC de la HPN también puede ser iniciada preferentemente por el LEA-2 y, en menor medida, por el LEA-1 (posiblemente amplificado por el circuito de amplificación de vía alternativa), en lugar del resultado de lectina independiente activación alternativa de la vía. Por lo tanto, se puede esperar que los inhibidores de LEA-2 sean más efectivos para limitar la opsonización y prevenir la hemólisis extravascular en la HPN. Sin embargo, el reconocimiento del hecho de que las lectinas distintas de MBL, como las ficolinas, se unen a estructuras no carbohidratadas como las proteínas acetiladas, y que la MASP-3 se asocia preferentemente con la H-ficolina (Skjoedt y col., *Immunobiol.* 215: 921-931, 2010), deja abierta la posibilidad de un papel significativo para LEA-1 en la opsonización de RBC asociada a HPN también. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de LEA-1 tengan efectos anti-opsonización adicionales, y se espera que la combinación de los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 sea óptima y medie el beneficio más sólido del tratamiento para limitar la opsonización y la hemólisis extravascular en pacientes con HPN. Este concepto está respaldado por los datos de opsonización que se muestran en la figura 28: el suero de ratón con déficit de factor D (que carece de la capacidad de activar la vía alternativa en fase fluida, pero que tiene una vía clásica funcional así como las vías LEA-1 y LEA-2 funcionales) no muestra déficit en la opsonización, en comparación con el suero WT. El suero con deficiencia en factor B, que carece de LEA-1, muestra una opsonización reducida, mientras que el suero con deficiencia en el factor D tratado con anticuerpo monoclonal de la MASP-2 para bloquear la activación del complemento mediada por LEA-2 produce una supresión más marcada de la opsonización (figura 28). Es importante destacar que la adición de anticuerpo monoclonal de la MASP-2 al suero con deficiencia en factor B suprimió la opsonización de un modo más eficaz que el bloqueo de la MASP-2 o el bloqueo del factor D solo. Por lo tanto, el LEA-2 y el LEA-1 actúan de forma aditiva o sinérgica para promover la opsonización, y se espera que un inhibidor de LEA-1/LEA-2 multirreactivo o biespecífico sea más eficaz para bloquear la opsonización y la hemólisis extravascular en la HPN.

#### v. El papel de los inhibidores de la MASP-3 en la HPN

Utilizando un modelo *in vitro* de la HPN, demostramos que la activación del complemento y la hemólisis resultante en la HPN se inician mediante la activación de LEA-2 y/o LEA-1, y que no es una función independiente de la vía alternativa. Estos estudios usaron RBC sensibilizados con manano de varias especies de ratón, incluso glóbulos rojos de ratones con deficiencia de Crry (un importante regulador negativo de la vía del complemento terminal en ratones) así como RBC de ratones con deficiencia en CD55/CD59, que carecen de los mismos reguladores del complemento que están ausentes en pacientes con HPN). Cuando los RBC con deficiencia en Crry y sensibilizados con manano se expusieron al suero humano con suficiencia de complemento, los RBC se hemolizaron efectivamente a una concentración sérica del 3 % (figura 21 y 22), mientras que el suero carente de complemento (HI: inactivado por calor) no fue hemolítico. Sorprendentemente, el suero con suficiencia del complemento donde LEA-2 se bloqueó mediante la adición de anticuerpo de la MASP-2 tuvo una actividad hemolítica reducida, y se necesitó un 6 % de suero para la hemólisis efectiva. Se hicieron observaciones similares cuando se ensayaron RBC con deficiencia en CD55/CD59 (figura 24). El suero humano con complemento suficiente suplementado con anticuerpo monoclonal de la MASP-2 (es decir, suero en el que se suprime LEA-2) fue aproximadamente dos veces menos eficaz que el suero no tratado para respaldar la hemólisis. Además, se necesitaron concentraciones más altas de suero bloqueado con LEA-2 (es decir, tratado con anticuerpo monoclonal anti-MASP-2) para promover la

hemólisis efectiva de los glóbulos blancos de WT no tratados, en comparación con el suero no tratado (figura 23).

Aún más sorprendentemente, el suero de un paciente con 3MC homocigótico para una proteína de la MASP-3 disfuncional (y por lo tanto carente de LEA-1) fue completamente incapaz de hemolizar los RBC con deficiencia en Crry y sensibilizados con manano (figura 22 y figura 23). Se observó un resultado similar cuando se usaron RBC normales no sensibilizados: tal como se muestra en la figura 23, el suero defectuoso en LEA-1 aislado de un paciente con 3MC fue completamente ineficaz para mediar en la hemólisis. En conjunto, estos datos indican que mientras el LEA-2 contribuye significativamente a la respuesta de la hemólisis intravascular, el LEA-1 es la vía de iniciación del complemento predominante que conduce a la hemólisis. Por lo tanto, aunque se espera que los agentes bloqueadores LEA-2 reduzcan significativamente la hemólisis intravascular de los glóbulos rojos en pacientes con HPN, es previsible que los agentes bloqueadores LEA-1 tengan un efecto más profundo y eliminen en gran medida la hemólisis impulsada por el complemento.

Debe observarse que el suero del paciente con 3MC con deficiencia en LEA-1 utilizado en este estudio poseía una vía alternativa disminuida pero funcional cuando se la probó en condiciones de ensayo de vía alternativa convencional (figura 17). Este hallazgo sugiere que el LEA-1 hace una mayor contribución a la hemólisis que la actividad de la vía alternativa, como se define convencionalmente en este entorno experimental de la HPN. Por deducción, se da a entender que los agentes bloqueadores del LEA-1 serán al menos tan efectivos como los agentes que bloquean otros aspectos de la vía alternativa en la prevención o el tratamiento de la hemólisis intravascular en pacientes con HPN.

#### vi. Papel de los inhibidores MASP-2 en HPN

Los datos presentados aquí sugieren los siguientes mecanismos patogénicos para la anemia en HPN: hemólisis intravascular debida a la activación no regulada de los componentes terminales del complemento y lisis de los RBC por formación de la MAC, que se inicia predominante aunque no exclusivamente, por el LEA-1, y la hemólisis extravascular causada por opsonización de los RBC por C3b, que parece iniciarse predominantemente por el LEA-2. Si bien es evidente un papel discernible para el LEA-2 en el inicio de la activación del complemento y la promoción de la formación de la MAC y hemólisis, este proceso parece ser sustancialmente menos eficaz que la activación del complemento iniciada por el LEA-1 que conduce a la hemólisis. Por lo tanto, se espera que los agentes bloqueadores de LEA-2 reduzcan significativamente la hemólisis intravascular en pacientes con HPN, aunque es previsible que esta actividad terapéutica sea solo parcial. En comparación, se espera una reducción más sustancial en la hemólisis intravascular en pacientes con HPN para agentes bloqueadores de LEA-1.

La hemólisis extravascular, un mecanismo menos dramático pero igualmente importante de la destrucción de los glóbulos rojos que conduce a la anemia en HPN, es principalmente el resultado de la opsonización por C3b, que parece estar mediado predominantemente por el LEA-2. Por lo tanto, se puede esperar que los agentes bloqueadores de LEA-2 bloqueen preferentemente la opsonización de RBC y la consiguiente hemólisis extravascular en la HPN. Es previsible que esta actividad terapéutica única de los agentes bloqueadores de LEA-2 proporcione un beneficio de tratamiento significativo para todos los pacientes con HPN, ya que hoy en día no existe tratamiento para aquellos pacientes con HPN que sufren este proceso patogénico.

#### vii. Inhibidores del LEA-2 como tratamiento adyuvante de los inhibidores del LEA-1 o agentes bloqueadores del complemento terminal

Los datos presentados aquí detallan dos mecanismos patogénicos para la depuración de los RBC y la anemia en la HPN que pueden ser dirigidos, por separado o en combinación, por clases distintas de agentes terapéuticos: la hemólisis intravascular iniciada de un modo predominante, aunque no exclusivo, por el LEA-1 y por lo tanto previsible que pueda ser prevenido de un modo eficaz por un agente bloqueador del LEA-1, y la hemólisis extravascular debida a la opsonización de C3b impulsada predominantemente por el LEA-2, y así evitada efectivamente por un agente bloqueador de LEA-2.

Está bien documentado que los mecanismos de hemólisis, tanto intravasculares como extravasculares, conducen a la anemia en pacientes con HPN (Risitano y colaboradores, *Blood* 113: 4094-4100 (2009)). Por lo tanto, es de esperar que un agente bloqueador del LEA-1 que prevenga la hemólisis intravascular en combinación con un agente bloqueador de LEA-2 que prevenga principalmente la hemólisis extravascular sean más efectivos que cualquiera de los agentes solos para prevenir la anemia que se desarrolla en pacientes con HPN. De hecho, es previsible que la combinación de agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 evite todos los mecanismos relevantes de iniciación del complemento en la HPN y así bloquee todos los síntomas de la anemia en la HPN.

También se sabe que los agentes bloqueadores de C5 (como eculizumab) bloquean eficazmente la hemólisis intravascular, pero no interfieren con la opsonización. Esto deja a algunos pacientes con HPN tratados con anti-C5 con una anemia residual sustancial, debido a la hemólisis extravascular mediada por el LEA-2 que permanece sin tratar. Por lo tanto, es de esperar que un agente bloqueador de C5 (como eculizumab), que previene la hemólisis intravascular, en combinación con un agente bloqueador LEA-2, que reduce la hemólisis extravascular, sean más efectivos que cualquiera de los dos agentes solos para prevenir la anemia que se desarrolla en pacientes con HPN.

También se prevé que otros agentes que bloquean el bucle de amplificación terminal del sistema del complemento que conduce a la activación de C5 y al depósito de MAC (incluidos, entre otros, los agentes que bloquean la properdina, el factor B o el factor D o que potencian la actividad inhibitoria del factor I, factor H o de otros factores inhibidores del complemento) inhiban la hemólisis intravascular. Sin embargo, no es de esperar que estos agentes interfieran con la opsonización mediada por el LEA-2 en pacientes con HPN. Esto deja a algunos pacientes con HPN y tratados con dichos agentes con una anemia residual sustancial, debido a la hemólisis extravascular mediada por el LEA-2 que permanece sin tratar. Por lo tanto, es previsible que el tratamiento con tales agentes que previenen la hemólisis intravascular, en combinación con un agente bloqueador del LEA-2 que minimiza la hemólisis extravascular, sea más efectivo que cualquiera de los dos agentes solos para prevenir la anemia que se desarrolla en pacientes con HPN. De hecho, se prevé que la combinación de tales agentes y un agente bloqueador de LEA-2 evite todos los mecanismos relevantes de destrucción de los RBC en la HPN y así bloquee todos los síntomas de anemia en HPN.

#### viii. Uso de anticuerpos múltiples, biespecíficos o panespecíficos de LEA-1 y LEA-2 para tratar la HPN

Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloqueen individualmente LEA-1 y LEA-2, y que por tanto bloqueen todos los eventos de activación del complemento que median la hemólisis intravascular y extravascular, brinde el mejor resultado para pacientes con HPN. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tiene actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tiene actividad bloqueadora de LEA-2. En algunos casos, las actividades bloqueadoras de LEA-1 y LEA-2 se combinan en una sola entidad molecular, y esa entidad con actividad combinada de LEA-1 y LEA-2 bloqueará eficazmente la hemólisis intravascular y extravascular y prevendrá la anemia en la HPN. Tal entidad puede comprender un anticuerpo biespecífico — o consistir en él— donde un sitio de combinación del antígeno reconoce específicamente a la MASP-1 y bloquea al LEA-1 y disminuye el LEA-2, y el segundo sitio de combinación del antígeno reconoce específicamente a la MASP-2 y bloquea además al LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente a la MASP-3 y, por lo tanto, bloquea al LEA-1, y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente a la MASP-2 y bloquea al LEA-2. Dicha entidad puede consistir óptimamente en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto a la MASP-1 como a la MASP-3 y así bloquea al LEA-1 y disminuye el LEA-2 mientras que el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente a la MASP-2 y bloquea también al LEA-2. Sobre la base de las similitudes en la secuencia y arquitectura de la proteína en general, también puede contemplarse que es posible desarrollar un anticuerpo convencional con dos sitios de unión idénticos que se unan específicamente a MASP-1 y a MASP-2 y a MASP-3 de una manera funcional, logrando así el bloqueo funcional de LEA-1 y LEA-2. Se espera que dicho anticuerpo con actividad inhibitoria de pan-MASP bloquee tanto la hemólisis intravascular como la extravascular y, por lo tanto, trate eficazmente la anemia en pacientes con HPN.

#### IV. AGENTES INHIBIDORES DE LA MASP

Con el reconocimiento de que la vía de la lectina del complemento está compuesta por dos ramas principales de activación del complemento, LEA-1 y LEA-2, y que también hay una rama de activación del complemento independiente de la lectina, se llega a la conclusión de que sería muy deseable inhibir específicamente uno o más de estas ramas efectoras que causan una patología asociada con la HPN sin cerrar por completo las capacidades de defensa inmune del complemento (es decir, dejar la vía clásica intacta). Esto dejaría intacto el sistema de activación del complemento dependiente de C1q para manejar el procesamiento del complejo inmunitario y ayudar en la defensa del hospedador contra la infección.

##### i. Composiciones para inhibir la activación del complemento mediado por el LEA-1

Como se describe en este documento, los inventores han descubierto inesperadamente que la activación de LEA-1, que conduce a la lisis, es dependiente de la MASP-3. Como se describe además aquí, en condiciones fisiológicas, la activación de LEA-1 dependiente de la MASP-3 también contribuye a la opsonización, proporcionando así un efecto aditivo con la activación del complemento mediada por el LEA-2. Como se demuestra en el ejemplo 7, en presencia de  $Ca^{++}$ , no se requiere factor D, ya que la MASP-3 puede impulsar la activación de LEA-1 en los sueros con factor  $D^{-/-}$ . La MASP-3, la MASP-1 y la HTRA-1 son capaces de convertir el pro-factor D en factor activo D. Asimismo, la activación de la MASP-3 parece depender, en muchos casos, de la MASP-1, ya que la MASP-3 (en contraste con la MASP-1 y la MASP-2) no es una enzima de autoactivación y es incapaz de convertirse en su forma activa sin la ayuda de la MASP-1 (Zundel, S. y col., *J Immunol.*, **172**: 4342- 4350 (2004); Megyeri y colaboradores, *J Biol. Chem.* **288**: 8922 - 8934 (2013). Como la MASP-3 no se autoactiva y, en muchos casos, requiere que la actividad de la MASP-1 para convertirse en su forma enzimáticamente activa, la activación mediada por la MASP-3 de C3Bb de la C3 convertasa de la vía alternativa puede inhibirse dirigiendo el zimógeno de MASP-3 o la MASP-3 ya activada, o dirigiendo la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1, o ambas, dado que, en muchos casos, en ausencia de actividad funcional de la MASP-1, la MASP-3 permanece en su forma de zimógeno y no es capaz de impulsar el LEA-1 a través de la formación directa de la C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb).

El componente de proteína preferido como objetivo en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir específicamente el LEA-1 es un inhibidor de la MASP-3 (incluidos los inhibidores de la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1 (por ejemplo, un inhibidor de la MASP-1 que inhibe MASP-3 activación)).

5 De acuerdo con lo anterior, la descripción proporciona métodos para inhibir los efectos adversos del LEA-1 (es decir, la hemólisis y la opsonización) en un sujeto que padece HPN, o en riesgo de desarrollar HPN, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Los agentes inhibidores de la MASP-3 se administran en una cantidad eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en un sujeto vivo que padece o está en riesgo de desarrollar HPN. Los agentes inhibidores de la MASP-3 representativos incluyen: moléculas que inhiben la actividad biológica de la MASP-3, que incluyen moléculas que inhiben al menos uno o más de los siguientes: activación del factor B dependiente de la MASP-3 de la lectina, activación del pro-factor D dependiente de la MASP-3 de la lectina, activación del factor B independiente de la lectina, dependiente de la MASP-3 y activación del profactor D independiente de la lectina dependiente de la MASP-3 (tales como inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos y fragmentos de la MASP-3 o péptidos bloqueantes que interactúan con la MASP-3 o interfieren con una interacción proteína-proteína) y moléculas que disminuyen la expresión de la MASP-3 (tales como moléculas de ácido nucleico antisentido de la MASP-3, moléculas de ARNi específicas de la MASP-3 y ribozimas de la MASP-3). Un agente inhibidor de la MASP-3 puede bloquear eficazmente las interacciones proteína-proteína de la MASP-3, interferir con la dimerización o ensamblaje de la MASP-3, bloquear la unión a  $Ca^{++}$ , interferir con el sitio activo de serina proteasa de la MASP-3 o reducir la expresión de proteína de la MASP-3, evitando así que la MASP-3 impulse la activación del complemento mediada por el LEA-1 o independiente de la lectina. Los agentes inhibidores de la MASP-3 se pueden usar solos como una terapia primaria o en combinación con otros agentes terapéuticos como una terapia adyuvante para mejorar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos, como se describe adicionalmente en este documento.

25 En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento. En otro caso, un agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente a una porción de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento.

30 En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente al dominio de serina proteasa de la MASP-3 (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8) e inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-3, con la condición de que el agente inhibidor no se una al dominio serina proteasa de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), y no se una al dominio de serina proteasa de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5). En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es un anticuerpo monoclonal de la MASP-3, o fragmento del mismo, que se une específicamente a MASP-3.

35 En otro caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento e inhibe la activación mediada por la MASP-1 de la MASP-3. En otro caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que a otros componentes (es decir, polipéptidos o fragmentos de los mismos) en el sistema del complemento e inhibe la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1. En algunos casos, el agente inhibidor de la MASP-3 se une específicamente al dominio de serina proteasa de la MASP-1 (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10) e inhibe la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1, con la condición de que el agente inhibidor no se una al dominio de serina proteasa de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5), y no se una al dominio de serina proteasa de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8). En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es un anticuerpo monoclonal MASP-1, o fragmento del mismo, que se une específicamente a MASP-1 e inhibe la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1. En algunos casos, el agente inhibidor de la MASP-3 que se une a MASP-1 inhibe la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1 y además inhibe la maduración mediada por la MASP-1 del factor D.

40 En otro caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une a una porción de la MASP-3 (SEQ ID ON: 8) y también se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), con la condición de que el agente inhibidor no se una a la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5), o MAp19 (ID. DE SEC. N.º 3). En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une a una porción de la MASP-3 (SEQ ID ON: 8) y también se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), con la condición de que el agente inhibidor no se una a MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) o MAp19 (ID. DE SEC. N.º 3). En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 se une a una porción de la MASP-3 (SEQ ID ON: 8) y también se une a una porción de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), con la condición de que el agente inhibidor no se una a MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5), MAp19 (ID. DE SEC. N.º 3) o MAp44 (ID. DE SEC. N.º 11), proporcionando de ese modo una dosis inferior efectiva para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 debido a la falta de unión a MAp44, que está presente a una alta concentración en suero humano.

60

En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es un agente inhibidor dual MASP-1/MASP-3 que se une a un epítipo dentro de la región de aminoácidos que se conserva entre MASP-1 y MASP-3, como el dominio CUBI-CCP2 (aa 25-432 de la ID. DE SEC. N.º 10), como se ilustra en las figuras 3-5. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es un agente inhibidor dual de MASP-1/MASP-3 que se une a un epítipo dentro de la región de aminoácidos que se conserva entre MASP-1 y MASP-3, con la condición de que el inhibidor el agente no se una a MAp44, tal como el dominio CCP (aa 367-432 de la ID. DE SEC. N.º 10). En otro caso, el agente inhibidor de la MASP-3 es un agente inhibidor biespecífico, tal como un anticuerpo monoclonal biespecífico, que se une específicamente a un epítipo en la proteína de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y un epítipo en la proteína de MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10). En algunos casos, el agente inhibidor de la MASP-3 es un anticuerpo monoclonal biespecífico que se une al dominio serina proteasa de la MASP-1 (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10) y también se une a un dominio en la serina proteasa de la MASP -3 (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8).

La afinidad de unión de los agentes inhibidores de la MASP-3 puede determinarse usando un ensayo de unión adecuado.

La inhibición de la activación del complemento dependiente de la MASP-3 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de la MASP-3 de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de la activación del complemento mediada por el LEA-1 (inhibición de la hemólisis y/o opsonización); inhibición de la conversión del factor B independiente de la lectina; inhibición de la conversión independiente de la lectina del factor D, inhibición de la escisión específica de sustrato de serina proteasa de la MASP-3, reducción de la hemólisis (medida, por ejemplo, como se ha descrito en el ejemplo 5) o la reducción de la escisión de C3 y el depósito de C3b (que se miden, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 y en el ejemplo 11).

En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-3 inhiben selectivamente la activación de complemento de la MASP-3 (es decir, la activación de complemento de LEA-1 y/o conversión independiente de la lectina del factor B y/o la conversión independiente de la lectina del factor D), dejando funcionalmente intacto el sistema de activación de complemento dependiente de C1q.

En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-3 son anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos MASP-3 y fragmentos de unión a MASP-3 de los mismos, anticuerpos de MASP-1 y fragmentos de los mismos, péptidos naturales y sintéticos o moléculas pequeñas. En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-3 son inhibidores de la proteasa de moléculas pequeñas que son selectivos para la MASP-1, selectivos para la MASP-3 o selectivos para la MASP-1 y la MASP-3.

#### ii. Composiciones para inhibir la activación de LEA-2

Como se describe en la presente, la activación del complemento de LEA-2 depende de la MASP-2-, lo que conduce a la opsonización y/o a la lisis. Por lo tanto, el componente proteico preferido a abordar en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir específicamente el sistema del complemento dependiente de la lectina de LEA-2 es la MASP-2. Se ha demostrado que varias proteínas se unen o interactúan con la MASP-2 a través de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, se sabe que la MASP-2 se une a las proteínas de lectina MBL, H-ficolina y L-ficolina y colectina-11 y forma complejos dependientes de calcio con ellas. Ma Y., y col., *J Innate Immun.* Epub 4 de diciembre (2012). Se ha demostrado que cada complejo MASP-2/lectina activa la producción del complemento a través de la escisión dependiente de la MASP-2 de las proteínas C4 y C2 (Ikeda, K., y col., *J Biol. Chem.* 262: 7451-7454, (1987); Matsushita, M., y col., *J Exp. Med.* 176: 1497 - 2284, (2000); Matsushita, M., y col., *J. Immunol.* 168: 3502 - 3506, (2002)). Los estudios han demostrado que los dominios CUB1 -EGF de la MASP-2 son esenciales para la asociación de la MASP-2 con MBL (Thielens, N.M., y col., *J. Immunol.*, 166: 5068, (2001)). También se ha demostrado que los dominios CUB1EGFCUBII median la dimerización de la MASP-2, que se requiere para la formación de un complejo de MBL activo (Wallis, R., y col., *J Biol. Chem.* 275: 30962-30969, 2000). Por lo tanto, se pueden identificar agentes inhibidores de la MASP-2 que se unan o interfieran con las regiones diana de la MASP-2 que, según se sabe, son importantes para la activación del complemento dependiente de la MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona métodos para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento de LEA-2 en un sujeto que padece HPN, o que corre el riesgo de desarrollar HPN, los cuales comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-2 y un fármaco farmacéuticamente aceptable.

Los agentes inhibidores de la MASP-2 se administran en una cantidad eficaz para inhibir el LEA-2 dependiente de la MASP-2 en un sujeto vivo que padece o está en riesgo de desarrollar HPN. Los agentes inhibidores de la MASP-2 representativos incluyen: moléculas que inhiben la actividad biológica de la MASP-2 (como inhibidores de molécula pequeña, anticuerpos de MASP-2 o péptidos bloqueadores que interactúan con la MASP-2 o interfieren con una interacción proteína-proteína), y moléculas que disminuyen la expresión de la MASP-2 (tales como moléculas de ácido nucleico antisentido de la MASP-2, moléculas de ARNi específicas de la MASP-2 y ribozimas MASP-2), impidiendo así que la MASP-2 active el LEA-2.

Un agente inhibidor de la MASP-2 puede bloquear eficazmente las interacciones proteína-proteína de la MASP-2, interferir con la dimerización o ensamblaje de la MASP-2, bloquear la unión a  $Ca^{++}$ , interferir con el sitio activo de serina proteasa de la MASP-2 o puede reducir la expresión de la proteína de la MASP-2, impidiendo así que la MASP-2 active el LEA-2. Los agentes inhibidores de la MASP-2 se pueden usar solos como una terapia primaria o en combinación con otros agentes terapéuticos como una terapia adyuvante para mejorar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos, como se describe adicionalmente en este documento.

En un caso, el agente inhibidor de la MASP-2 se une específicamente a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que a otros antígenos en el sistema del complemento. En otro caso, el agente inhibidor de la MASP-2 se une específicamente a una porción de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que a otros antígenos en el sistema del complemento. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-2 se une específicamente por al menos a uno de los siguientes: (i) el dominio CCP1-CCP2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5) o el dominio de serina proteasa de la MASP-2 (aa 445- 682 de la ID. DE SEC. N.º 5) e inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-2, con la condición de que el agente inhibidor no se una al dominio de serina proteasa de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), y no se una al dominio de serina proteasa de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8). En un caso, el agente inhibidor de la MASP-2 es un anticuerpo monoclonal de MASP-2, o un fragmento del mismo que se une específicamente a MASP-2.

La afinidad de unión del agente inhibidor de la MASP-2 puede determinarse usando un ensayo de unión adecuado.

La inhibición de la activación del complemento dependiente de la MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de la MASP-2, de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de la generación o producción de los productos de sistema de activación del complemento dependientes de la MASP-2 C4b, C3a, C5a y/o C5b-9 (MAC) (medidos, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 2 de la patente de los Estados Unidos No. 7.919.094 ), la reducción de la escisión de C4 y el depósito de C4b (lo cual se mide, por ejemplo como se describe en el ejemplo 8 o en el ejemplo 9) o la reducción de la escisión de C3 y el depósito de C3b (medidos, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 11).

En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-2 inhiben selectivamente la activación del complemento MASP-2 (es decir, LEA-2), dejando funcionalmente intacto el sistema de activación del complemento dependiente de C1q.

En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-2 son anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos MASP-2 y fragmentos de los mismos de unión a la MASP-2, péptidos naturales y sintéticos, o moléculas pequeñas. En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-2 son inhibidores de proteasa de moléculas pequeñas, que son selectivos para MASP-2.

iii. Composiciones para inhibir la activación del complemento mediada por el LEA-1 y la activación del complemento mediada por el LEA-2

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir los efectos adversos de LEA-1 e inhibir los efectos adversos de LEA-2 en un sujeto que padece uno o más aspectos de HPN o que corre el riesgo de padecer HPN.

En un caso, este aspecto de la invención se refiere a un método para aumentar la supervivencia de los glóbulos rojos en un sujeto que padece HPN, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de al menos uno de los siguientes: un agente inhibidor de la MASP-1 y/o un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para aumentar la supervivencia de los glóbulos rojos. En un caso, la composición comprende un agente inhibidor de la MASP-1. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-1 inhibe la activación del complemento mediada por la MASP-3 y también inhibe la activación del complemento mediada por la MASP-2.

En un caso, la composición comprende un agente inhibidor de la MASP-3. En un caso, el agente inhibidor de la MASP-3 inhibe al menos uno de lo siguiente: la activación del factor B dependiente de la lectina MASP-3; la activación del factor D dependiente de la MASP-3 de la lectina; la activación del factor B dependiente de la MASP-3 e independiente de la lectina; y/o la activación del factor D dependiente de la MASP-3, independiente de la lectina.

En un caso, la composición comprende un agente inhibidor de la MASP-1 y un agente inhibidor de la MASP-3.

En algunos casos, el método comprende, además, administrar al sujeto una composición que comprende un agente inhibidor de la MASP-2.

En otro caso, este aspecto de la invención comprende administrar a un sujeto que padece HPN una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-2 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-2 y una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En algunos casos, la composición comprende un único agente que inhibe LEA-1 y LEA-2 (es decir, un agente inhibidor dual MASP-2/MASP-3, un agente inhibidor dual MASP-1/MASP-2, un agente inhibidor biespecífico de MASP-2/MASP-3, un agente inhibidor biespecífico de MASP-1/MASP-2, o un agente inhibidor de pan-MASP-1/2/3 o agente inhibidor trispecífico de MASP-1/2/3). En algunos casos, la composición comprende una combinación de agentes inhibidores de LEA-1 y LEA-2, por ejemplo, una combinación de agentes inhibidores duales más un único agente inhibidor, una combinación de agentes inhibidores biespecíficos más un único agente inhibidor, o una combinación de cualquiera de los agentes inhibidores de MASP-1, MASP-2 y/o MASP-3 como se describe en la presente que, en combinación, inhiben tanto al LEA-1 como al LEA-2, según se describe adicionalmente en este documento.

10 En un caso, se proporciona una composición farmacéutica para inhibir tanto al LEA-1 como al LEA-2, que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y al menos un agente inhibidor de la MASP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica comprende una combinación de una primera molécula que es un agente inhibidor de la MASP-3 y una segunda molécula que es un agente inhibidor de la MASP-2. En otro caso, la composición farmacéutica comprende una sola entidad molecular, que incluye actividad como agente inhibidor de la MASP-3 y actividad como agente inhibidor de la MASP-2 (es decir, un agente inhibidor que inhibe tanto la activación de LEA-2 mediada por la MASP-2 como la activación de LEA-1 mediada por la MASP-3). En un caso, el agente inhibidor es un agente inhibidor dual de MASP-2/MASP-3, que se une a un epítipo dentro de una región de aminoácidos que se conserva entre MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8), como el dominio de serina proteasa, por ejemplo la región N-terminal de la cadena beta (por ejemplo, los primeros 150 aa de la región N-terminal de la cadena beta de la ID. DE SEC. N.º 5 e ID. DE SEC. N.º 8), como se muestra en las figuras 4, 6 y 7C. En un caso, el agente inhibidor es un agente inhibidor biespecífico, como un anticuerpo monoclonal biespecífico, que se une específicamente a un epítipo en la proteína de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y un epítipo en la proteína de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8). En algunos casos, el agente inhibidor es un anticuerpo monoclonal biespecífico que se une por lo menos a uno de los siguientes: el dominio CCP1-CCP2 de la MASP-2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5) o el dominio de serina proteasa de la MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5) y también se une a un epítipo en la serina proteasa de la MASP-3 (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8).

25 En otro caso, la descripción proporciona una composición para inhibir tanto al LEA-1 como al LEA-2, que comprende un agente inhibidor que inhibe tanto la activación de LEA-2 mediada por la MASP-2 como la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1, inhibiendo de este modo Activación de LEA-1 mediada por la MASP-3 (y opcionalmente también inhibición de la maduración mediada por la MASP-1 del factor D). En un caso, el agente inhibidor es un agente inhibidor dual MASP-1/MASP-2 que se une a un epítipo dentro de una región de aminoácidos que se conserva entre MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) y MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5), tal como el dominio de serina proteasa, como se muestra en las figuras 4, 6 y 7A. En un caso, el agente inhibidor es un agente inhibidor biespecífico, tal como un anticuerpo monoclonal biespecífico, que se une específicamente a un epítipo en la proteína de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) y un epítipo en la proteína de la MASP-2 (SEQ ID N0: 5). En algunos casos, el agente inhibidor es un anticuerpo monoclonal biespecífico que se une al dominio de serina proteasa de la MASP-1 (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10) y también se une a al menos uno de los dominios CCP1-CCP2 de la MASP-2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5) o al dominio de serina proteasa de la MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5).

40 En otro caso, la descripción proporciona una composición para inhibir tanto al LEA-1 como al LEA-2, que comprende un agente inhibidor que inhibe la activación de LEA-2 mediada por la MASP-2, la activación de LEA-1 mediada por la MASP-3 uniéndose directamente a MASP-3 y también inhibe la activación de la MASP-3 mediada por la MASP-1, inhibiendo así la activación de LEA-1 mediada por la MASP-3 (y opcionalmente también inhibiendo la maduración del factor D mediada por la MASP-1). En un caso, el agente inhibidor es un inhibidor de pan-MASP que se une a una región de aminoácidos que se conserva entre MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8), por ejemplo, una región conservada en el dominio CUBI-EGF-CUB2, como se muestra en las figuras 4 y 5. Como se ilustra en las figuras 4 y 5, hay numerosos parches de identidad compartidos entre MASP-1, MASP-2 y MASP-3 en los dominios CUBI-EGF-CUBII, lo que permite la generación de anticuerpos MASP pan-específicos. En algunos casos, el anticuerpo de la MASP pan-específico puede unirse a un epítipo dentro del dominio CUB2 de la MASP-1 (aa 185-296 de la ID. DE SEC. N.º 10), MASP-2 (aa 184-295 de la ID. DE SEC. N.º 5) y MASP-3 (aa 185-296 de la ID. DE SEC. N.º 8). Se observa que un inhibidor de la MASP pan-específico que se une a CUBI-EGF de la MASP-1, MASP-2 y MASP-3 también se uniría a MAp19 y MAp44, por lo tanto, la dosis terapéutica efectiva de dicho inhibidor se ajustaría a un nivel superior para compensar esta unión. Se observa además que un inhibidor de la MASP pan-específico que se une al dominio CUBII de la MASP-1, MASP-2 y MASP-3 también se uniría a MAp44 y, por lo tanto, la dosis terapéutica efectiva de dicho inhibidor se ajustaría a un nivel superior para compensar esta unión.

60 En un caso, el agente inhibidor es un inhibidor trispecífico de la MASP-1/2/3 que se une a un epítipo en la proteína de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), a un epítipo en la proteína de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) y a un epítipo en la proteína de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8). En algunos casos, el agente inhibidor es un anticuerpo monoclonal trispecífico que se une al dominio serina proteasa de la MASP-1 (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10), que se une por lo menos a uno de los dominios CCP1-CCP2 de la MASP-2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5) o al dominio de serina proteasa de la MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5) y también se une a un epítipo en la serina

proteasa de la MASP-3 (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8).

Los ejemplos de agentes inhibidores para inhibir LEA-1, LEA-2 o LEA-1 y LEA-2 se describen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: agentes inhibidores de la MASP

Tipo de inhibidor de la MASP	Dominio/s de unión al inhibidor	Reactividad cruzada*	Ensayo de la actividad inhibidora	Utilidad terapéutica
Específico de la MASP-3	Dominio de la serina proteasa MASP-3 (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8)	Se une a MASP- 3; no a MASP- 1; MASP-2; MAp44 o MAp19	Inhibición de la escisión específica del sustrato de la serina proteasa de MASP-3; Inhibición de LEA-1, ensayo para la inhibición de la activación del factor D; inhibición de la hemólisis de los RBC no humanos por suero humano	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 (inhibe la lisis y la opsonización)
Específico de la MASP-2	Dominio de MASP-2 CCP1-CCP2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5); o dominio de serina proteasa de la MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5)	Se une a MASP- 2; no a MASP- 1; MASP-3; MAp19 ni a MAp44	Inhibición de la escisión específica del sustrato de la proteasa específica de la MASP-2, inhibición de LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-2- (inhibe la opsonización y/o la lisis)
Específico de la MASP-1	Dominio de la serina proteasa de MASP-1 (aa449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10)	Se une a MASP- 1; no a MASP-2, MASP-3, MAp44 ni a MAp19	Inhibición la escisión específica del sustrato de la proteasa específica de MASP-1; inhibición de LEA-1 y LEA2, ensayo para la inhibición de la activación del factor D; ensayo para restaurar la actividad de AP-1 en el suero carente de factor D, suplementado con pro-factor D	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 y LEA-2 (inhibe la lisis y/o la opsonización)
Inhibidor dual de MASP-2/MASP-3 (un anticuerpo se une una región conservada)	Región del dominio de la serina proteasa conservada entre la MASP-2 y la MASP-3, especialmente la región N-terminal de la cadena beta (primeros 150aa)	Se une a MASP-2 y a MASP-3; no a MASP-1, MAp44, ni a MAp19.	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-2 y MASP-3. Inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2

ES 2 670 668 T3

Tipo de inhibidor de la MASP	Dominio/s de unión al inhibidor	Reactividad cruzada*	Ensayo de la actividad inhibidora	Utilidad terapéutica
Inhibidor dual de MASP-1/3 que excluye MAp44	Dominio CCP2 de MASP-1/3 (aa 367-432 de la ID. DE SEC. N.º 10)	Se une a MASP-1 and MASP-3; no a MAp44, MASP-2 o MAp19	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-3 y MASP-1 e inhibición de la activación del factor D; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Inhibidor dual de MASP-1/3 que incluye MAp44	Dominio CUBI-CCP1 de MASP-1/3 (aa25-363 de la ID. DE SEC. N.º 10)	Se une a MASP-1, MASP-3, y a MAp44; no a MASP-2 o MAp19	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-3 y MASP-1 e inhibición de la activación del factor D; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Inhibidor dual de MASP-1/2	Región del dominio de serina proteasa conservada entre MASP-1 y MASP-2	Se une a MASP-1 y a MASP-2; no a MASP-3, MAp19 o MAp44	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-1 y MASP-2; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Pan-inhibidor de MASP-1/2/3	Región conservada de CUB1-EGF-CUB2, especialmente, el dominio de CUB2 (sitio de interacción común)	Además de a MASP-1/2/3, se uniría a MAp44 y posiblemente a MAp19	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa específica para MASP-1, MASP-2 y MASP-3 e inhibición del factor D; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Inhibidor biespecífico de MASP-2/MASP-3	Unión específica de MASP-2 a CCP1-CCP2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5); o dominio de la serina proteasa de MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5) y unión específica de MASP-3 al dominio de serina proteasa (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8)	Se une a MASP-2 y a MASP-3; no a MASP-1, MAp44 o MAp19	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa específica para MASP-2 y MASP-3; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)

Tipo de inhibidor de la MASP	Dominio/s de unión al inhibidor	Reactividad cruzada*	Ensayo de la actividad inhibidora	Utilidad terapéutica
Inhibidor biespecífico de MASP-1/MASP-2	Dominio de serina proteasa de MASP-1 (aa449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10), y unión específica de la MASP-2 a CCP1-CCP2 (aa 300-431 de la ID. DE SEC. N.º 5); o dominio de serina proteasa de MASP-2 (aa 445-682 de la ID. DE SEC. N.º 5)	Se une a MASP-1 y a MASP-2; no a MASP-3, MAp19 o MAp44	Ensayo para la inhibición de la escisión específica del sustrato de la proteasa específica para MASP-1 y MASP-2; inhibición de LEA-1 y LEA- 2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Inhibidor biespecífico de MASP-1/MASP-3	Dominio de serina proteasa de MASP-1 (aa449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10) y unión específica de MASP-3 al dominio de la proteasa (aa 450-711 de la ID. DE SEC. N.º 8)	Se une a MASP-1 y a MASP-3; no a MASP-2, MAp44 o MAp19	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-1 y MASP-3 e inhibición de la activación del factor D; inhibición de LEA-1 y LEA-2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 y LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)
Inhibidor trispecífico de MASP-1/MASP-2 y MASP-3	Dominio de serina proteasa de MASP-1, dominio de serina proteasa de MASP-2 o dominio CCP-CCP2 y dominio de serina proteasa de MASP-3	Se une a MASP-1 y a MASP-2; y a MASP-3, no a MAp19 o MAp44	Ensayo para la escisión específica del sustrato de la proteasa de MASP-1, MASP-2 y MASP-3 e inhibición de la activación del factor D; inhibición de LEA-1 y LEA- 2	Inhibe la activación del complemento mediada por LEA-1 and LEA-2 (inhibe la lisis y/o opsonización)

\* Con respecto a la columna de reactividad cruzada como se expone en la tabla 2, el inhibidor de la MASP designado se une al dominio de unión del inhibidor con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor (por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor) que a los otros componentes del complemento (es decir, polipéptidos o fragmentos de los mismos) enumerados como que “no” se unen.

5

En algunos casos, la composición comprende una combinación de agentes inhibidores de LEA-1 y LEA-2, por ejemplo, una combinación de agentes inhibidores únicos como se describió anteriormente y como se muestra en la tabla 2. Por ejemplo, la composición comprende una combinación de un anticuerpo de MASP-1 y un anticuerpo de la MASP-2. En un caso, la composición comprende una combinación de un anticuerpo de la MASP-1 y un anticuerpo de la MASP-3. En un caso, la composición comprende una combinación de un anticuerpo de la MASP-2 y un anticuerpo de la MASP-3. En un caso, la composición comprende una combinación de un anticuerpo de la MASP-1 y de la MASP-2 y de la MASP-3. En algunos casos, los métodos de la invención comprenden la administración de una única composición que comprende una combinación de agentes inhibidores. En otros casos, los métodos de la invención comprenden la coadministración de composiciones separadas.

10

15

En algunos casos, las composiciones comprenden una combinación de un agente inhibidor dual más un único agente inhibidor (es decir, un inhibidor dual de MASP-2/3 más un inhibidor de la MASP-1, un inhibidor dual de MASP-1/3 más un MASP-2 inhibidor, o un inhibidor dual de MASP-1/2 más un inhibidor de la MASP-3). Los métodos

de la invención comprenden la coadministración de composiciones separadas que comprenden un inhibidor dual y un único inhibidor.

5 En algunos casos, las composiciones comprenden una combinación de un agente inhibidor biespecífico más un único agente inhibidor (es decir, un inhibidor biespecífico MASP-2/3 más un inhibidor de la MASP-1, un inhibidor biespecífico MASP-1/3 más un MASP-2 inhibidor, o un inhibidor biespecífico MASP-1/2 más un inhibidor de la MASP-3). Los métodos de la invención comprenden la administración conjunta de composiciones separadas que comprenden un inhibidor biespecífico y un único inhibidor.

10 Se observa que los agentes inhibidores de la MASP-3 y/o los agentes inhibidores de la MASP-2 y/o los agentes inhibidores de la MASP-1 se usarían para eliminar la proteína diana del plasma, en comparación con un anticuerpo C5 que debe localizarse en el sitio de acción.

V. Anticuerpos de la MASP

15 El agente inhibidor de la MASP comprende un anticuerpo de la MASP (por ejemplo, un anticuerpo de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3) que inhibe al menos una de las vías de activación del complemento LEA-1 y/o LEA-2. Los anticuerpos de la MASP útiles en este aspecto de la invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos y pueden ser multiespecíficos (es decir, biespecíficos o triespecíficos), quiméricos, humanizados, completamente humanos, anti-idiotipo y fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, fragmentos scFv y anticuerpos monocatenarios como se descrito en el presente documento.

20 Los anticuerpos de la MASP pueden cribarse para determinar la capacidad de inhibir el sistema de activación del complemento dependiente de LEA-1 o LEA-2, usando los ensayos descritos en este documento. Varios anticuerpos de MASP-1, MASP-2 y MASP-3 se han descrito en la bibliografía y algunos se han generado recientemente, algunos de los cuales se enumeran a continuación en la tabla 3. Estos anticuerpos de MASP ejemplares se pueden cribar para determinar la capacidad de inhibir el LEA-1 y/o el sistema de activación del complemento dependiente de LEA-2, usando los ensayos descritos en este documento. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos 11-13 del presente documento, se han identificado anticuerpos Fab2 de la MASP-2 anti-rata que bloquean la activación del complemento dependiente de la MASP-2. Como se describe adicionalmente en el ejemplo 14, se han identificado anticuerpos scFv de la MASP-2 completamente humanos, que bloquean la activación del complemento dependiente de la MASP-2. Como se describe adicionalmente en el ejemplo 15, se han generado anticuerpos MASP-3. Una vez que se identifica un anticuerpo de la MASP que funciona como un inhibidor de LEA-1 o LEA-2, se puede usar en una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria descriptiva, y también puede usarse para generar agentes inhibidores biespecíficos y triespecíficos, como se expone en la tabla 2 y se describe adicionalmente en este documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 8).

Tabla 3: anticuerpos específicos de MASP-1, MASP-2 y MASP-3

Diana	Antígeno	Tipo de anticuerpo	Referencia
MASP-2	Recombinante de MASP-2	Policlona de rata	Peterson, S.V., y colaboradores, <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
MASP-2	Fragmento de CCP1/2-SP recombinante humano (MoAb 8B5)	Anticuerpo monoclonal de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., y colaboradores, <i>J of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
MASP-2	MAp19 (MoAb 6G12) recombinante humano (reacciona de manera cruzada con MASP-2)	Anticuerpo monoclonal de rata (subclase IgG1)	Moller-Kristensen, M., y colaboradores, <i>J of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
MASP-2	hMASP-2	Anticuerpo monoclonal de ratón (S/P) Anticuerpo monoclonal de ratón (térn. N)	Peterson, S.V., y colaboradores, <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, Abril 1998

ES 2 670 668 T3

Diana	Antígeno	Tipo de anticuerpo	Referencia
MASP-2	hMASP-2 (dominio CCP 1-CCP2-SP)	Anticuerpo monoclonal de rata: Nimoab101, producido por la línea celular del hibridoma 03050904 (ECACC)	Documento de patente 2004/106384
MASP-2	hMASP-2 (de longitud completa, con etiqueta his)	Anticuerpos monoclonales murinos:  NimoAb104, producido por la línea celular del hibridoma M0545YM035 (DSMZ)  NimoAb108, producido por la línea celular del hibridoma M0545YM029 (DSMZ)  NimoAb109 producido por la línea celular del hibridoma M0545YM046 (DSMZ)  NimoAb110 producido por la línea celular del hibridoma M0545YM048 (DSMZ)	Documento de patente 2004/106384
MASP-2	MASP-2 de rata (de longitud completa)	Fragmentos de anticuerpo Fab2 de MASP-2	Ejemplos 11-12
MASP-2	hMASP-2 (de longitud completa)	Clones de scFv totalmente humanos	Ejemplo 14
MASP-1	hMASP-1 (de longitud completa)	Anticuerpos monoclonales de ratón:  MoAbs1E2 y 2B11 producidos por la línea celular del hibridoma 1E2 y 2B11 (no hacen reacción cruzada con MASP-2). Ambos anticuerpos reconocen la cadena pesada común tanto para la MASP-1 como para la MASP-3	Teraí I. y colaboradores, <i>Clin Exp Immunol</i> 110:317-323 (1997);  MoAb1E2: comercializado por Hycult Biotech Cat#HM2092  MoAb2B11: comercializado por Hycult Biotech: Cat#HM2093
MASP-1	hMASP-1 (de longitud completa)	Anticuerpo monoclonal de ratón 4C2	Endo M. y colaboradores, <i>Nephrol Dial Transplant</i> 13:1984-1990 (1998)
MASP-1	hMASP-1 (de longitud completa)	Anticuerpos de pollo de MASP-1	Ejemplo 15

Diana	Antígeno	Tipo de anticuerpo	Referencia
MASP-3	hMASP-3 (de longitud completa)	Anticuerpos monoclonales de ratón:  MoAb-7D8; MoAb-7B7; MoAb-8B3 y MoAb-5H3 MoAb-7D8 y mAb-5H3 son específicos de la MASP-3, otros hacen reacción cruzada con la MASP-1	Skjoedt y colaboradores, <i>Immunobiology</i> 215(11):921-31 (2010)
MASP-3	hMASP-3 (de longitud completa)	Anticuerpos monoclonales de rata 38:12-3,  No reconoce MASP-1	Moller-Kristensen y colaboradores, <i>Int'l Rev. Immunol.</i> 19:141 (2007); Comercializados por Hycult Biotech; Cat #HM2216
MASP-3	hMASP-3 (de longitud completa)	Anticuerpos de pollo MASP-3	Ejemplo 15

i. Anticuerpos MASP con función efectora reducida

En algunos casos, los anticuerpos MASP descritos en la presente memoria descriptiva tienen una función efectora reducida, con el fin de reducir la inflamación que puede surgir de la activación de la vía del complemento clásica. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG para desencadenar la vía clásica del complemento reside dentro de la porción de Fe de la molécula (Duncan, A.R., y colaboradores, *Nature* 332: 738 - 740 (1988)). Las moléculas de IgG en las que la porción de Fe de la molécula se ha eliminado por escisión enzimática están desprovistas de esta función efectora (véase Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). En consecuencia, los anticuerpos con función efectora reducida se pueden generar como resultado de la falta de la porción de Fe de la molécula al tener una secuencia de Fe modificada genéticamente que minimiza la función efectora, o que sea del isotipo IgG2 o IgG4 humano.

Los anticuerpos con función efectora reducida se pueden producir mediante manipulación biológica molecular estándar de la porción de Fe de las cadenas pesadas de IgG, como se describe en Jolliffe y col., *Int'l Rev. Immunol.* 10: 241 - 250, (1993), y Rodrigues y col., *J. Immunol.* 151: 6954 - 6961, (1998). Los anticuerpos con función efectora reducida también incluyen los isotipos IgG2 e IgG4 humanos que tienen una capacidad reducida para activar el complemento y/o interactuar con los receptores de Fe (Ravetch, JV, y col., *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492, (1991), Isaacs, JD, y col., *J. Immunol.*, 148: 3062 - 3071, 1992; van de Winkel, JG, y col., *Immunol. Today* 14: 215 - 221, (1993)). Los anticuerpos humanizados o completamente humanos específicos para MASP-1, MASP-2 o MASP-3 humanas (incluso los anticuerpos biespecíficos, biespecíficos o triespecíficos) compuestos por los isotipos IgG2 o IgG4 pueden producirse mediante uno de varios métodos conocidos por un experto con los conocimientos comunes en la materia, como se describe en Vaughan, TJ, y col., *Nature Biotechnical* 16: 535-539, (1998).

ii. Producción de anticuerpos de MASP

Los anticuerpos de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 pueden producirse utilizando polipéptidos de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 (por ejemplo, MASP-1 de longitud completa, MASP-1 o MASP-3) o utilizando MASP péptidos antigénicos portadores del epítipo de la MASP-1, 2 o 3 (por ejemplo, una porción del polipéptido de la MASP-2). Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como de cinco residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido de la MASP-2 que incluye la secuencia de aminoácidos completa de la ID. DE SEC. N.º 5 se puede usar para inducir anticuerpos MASP-2 útiles en el método de la invención. Los dominios particulares de MASP cuya participación en las interacciones proteína-proteína es sabida, tales como los dominios CUBI y CUBI-EGF, así como la región que abarca el sitio activo de la serina-proteasa, por ejemplo, como se expone en la tabla 2, pueden expresarse como polipéptidos recombinantes aplicando métodos ampliamente conocidos en la técnica y usados como antígenos. Además, los péptidos que comprenden una porción de al menos 6 aminoácidos del polipéptido de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), o del polipéptido de la MASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) o del polipéptido de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) también son útiles para inducir los anticuerpos MASP-1, MASP-2 o MASP-3, respectivamente. Los péptidos y polipéptidos de MASP usados para generar anticuerpos se pueden aislar como polipéptidos naturales, o péptidos recombinantes o sintéticos y polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos. Los antígenos útiles para producir anticuerpos de MASP también incluyen polipéptidos de fusión, tales como las fusiones de un polipéptido de la MASP o una porción del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El

inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción polipeptídica es del tipo hapteno, dicha porción se puede unir ventajosamente o enlazar a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*), albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) o toxoide tetánico) para la inmunización.

### 5 iii. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales contra MASP-1, MASP-2 o MASP-3 se pueden preparar inmunizando un animal con un polipéptido de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3 o con una porción inmunogénica del mismo, usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Green y colaboradores, "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.). La inmunogenia de un polipéptido de la MASP puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, entre los que se incluyen los geles minerales, tales como hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund (completo o incompleto), las sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, emulsiones oleosas, KLH y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonales se producen típicamente en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayos, cabras u ovejas. Alternativamente, un anticuerpo de la MASP útil en la presente invención también puede obtenerse de un primate infrahumano. Se pueden encontrar técnicas generales para generar anticuerpos útiles para el diagnóstico y el tratamiento en mandriles, por ejemplo, en Goldenberg y col., Publicación de patente internacional N.º WO 91/11465, y en Losman, M.J., y col., *Int. J. Cancer* 46: 310, (1990). Entonces se producen sueros que contienen anticuerpos inmunológicamente activos a partir de la sangre de tales animales inmunizados, usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

### 20 iv. Anticuerpos monoclonales

En algunos casos, el agente inhibidor de LEA-2 es un anticuerpo monoclonal de MASP-2 y/o el agente inhibidor de LEA-1 es un anticuerpo monoclonal de la MASP-3 o un anticuerpo monoclonal MASP-1. Como se describió anteriormente, en algunos casos, los anticuerpos monoclonales de MASP-1, MASP-2 y MASP-3 son altamente específicos, dirigidos contra un único epítipo de MASP-1, MASP-2 o MASP-3. Como se usa en el presente documento, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo, tal como el método de hibridoma descrito por Kohler, G., y col., *Nature* 256: 495, (1975), o se puede preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con el número 4.816.567 de Cabilly). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson, T., y col., *Nature* 352: 624-628, (1991), y Marks, J.D., y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581 - 597, (1991). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de ellas.

Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando un mamífero adecuado (por ejemplo, un ratón BALB/c) con una composición que comprende un polipéptido de la MASP-1, un polipéptido de la MASP-2 o un polipéptido de la MASP-3, o una porción del mismo. Después de un período predeterminado, los esplenocitos se eliminan del ratón y se suspenden en un medio de cultivo celular. Los esplenocitos se fusionan con una línea celular inmortal para formar un hibridoma. Los hibridomas formados crecen en un cultivo celular y se criban por su capacidad de producir un anticuerpo monoclonal contra MASP-1, MASP-2 o MASP-3. (Véase también *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, páginas 2.5.1-2.6.7, 1991).

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos mediante el uso de ratones transgénicos que se han modificado por ingeniería genética para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica. En esta técnica, los elementos del *locus* de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana se introducen en especies de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los *loci* de cadena pesada y cadena ligera de la inmunoglobulina endógena. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, tales como los antígenos de MASP-2 descritos en la presente memoria descriptiva, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos de MASP-2 humana, mediante la fusión de células B de tales animales a las células de mieloma adecuadas líneas usando la tecnología convencional Kohler-Milstein. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green, L.L., y col., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N., y col., *Nature* 368: 856, 1994; y Taylor, L.D., y col., *Int. Immun.* 6: 579, 1994.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines y colaboradores al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" en *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, páginas 79-104, 1992).

Una vez producidos, los anticuerpos policlonales, monoclonales o derivados de fagos se prueban primero para la unión específica de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3 o, cuando se desee, la unión dual de MASP-1/3, MASP-2/3 o MASP-1/2. Los métodos para determinar si un anticuerpo se une a un antígeno de proteína y/o la afinidad por un anticuerpo a un antígeno de proteína son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la unión de un anticuerpo a un antígeno proteico puede detectarse y/o cuantificarse usando una variedad de técnicas tales como, aunque no taxativamente, *Western blot*, *dot blot*, método de resonancia de superficie de plasmón (por ejemplo, sistema BIAcore; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ), o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assays*). Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide", W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering", 2ª Edición, Oxford University Press, NY, Oxford; Johne y colaboradores (1993), *Immunol. Meth.* 160: 191-198; Jonsson y colaboradores (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19 - 26; y Jonsson y colaboradores (1991) *Biotechniques* 11: 620 - 627. Ver también, la patente de Estados Unidos número 6.355.245.

La afinidad de los anticuerpos monoclonales MASP puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 51: 660 - 672, 1949). Los anticuerpos monoclonales de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 útiles para los métodos de la invención se unen a MASP-1, MASP-2 o MASP-3 con una afinidad de unión de <100 nM, preferiblemente <10 nM y por excelencia, de <2 nM.

Una vez que se identifican los anticuerpos que se unen específicamente a MASP-1, MASP-2 o MASP-3, los anticuerpos de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 se prueban para determinar la capacidad de funcionar como un agente inhibidor LEA-1 o un agente inhibidor de LEA-2 en uno de varios ensayos funcionales, por ejemplo como se describe en la tabla 2. Por ejemplo, los anticuerpos identificados que se unen específicamente a MASP-2 se prueban para la determinar su capacidad de funcionar como un agente inhibidor de LEA-2 en uno de varios ensayos, tales como, por ejemplo, como se describe en TABLA 2 (por ejemplo, un ensayo de escisión de C4 específico de lectina (tal como el ensayo descrito en el ejemplo 8 o en el ejemplo 9), o un ensayo de depósito de C3b (tal como el ensayo descrito en el ejemplo 4 o en el ejemplo 11). Como un ejemplo adicional, los anticuerpos identificados que se unen específicamente a MASP-1 o MASP-3 se prueban para determinar la capacidad de funcionar como un agente inhibidor de LEA-1 en uno de varios ensayos, tales como, por ejemplo, como se describe en la tabla 2 (por ejemplo, la reducción de la hemólisis, medida, por ejemplo como se describe en el ejemplo 5, o la reducción de la escisión de C3 y el depósito de C3b, medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 y el ejemplo 11).

#### v. Anticuerpos quiméricos/humanizados

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método de la invención incluyen anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la/s cadena/s es idéntico u homólogo respecto de las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567, de Cabilly; y Morrison, SL, y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81: 6851 - 6855, (1984)).

Una forma de un anticuerpo quimérico útil en la invención es un anticuerpo de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3 monoclonal humanizado. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de muridos) son anticuerpos quiméricos, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity determining regions*) no humanas (por ejemplo, ratón), desde las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Típicamente, los residuos de anticuerpos humanos se sustituyen luego en las regiones estructurales de sus contrapartidas no humanas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, al menos uno y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de marco Fv son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver Jones, P.T., y col., *Nature* 321: 522 - 525, (1986); Reichmann, L., y col., *Nature* 332: 323 - 329, (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 - 596, (1992).

Los anticuerpos humanizados útiles en la descripción incluyen anticuerpos monoclonales humanos que incluyen al menos una región CDR3 de unión a MASP-1, MASP-2 o MASP-3. Además, las porciones de Fe pueden reemplazarse para producir IgA o IgM así como anticuerpos IgG humanos. Dichos anticuerpos humanizados tendrán utilidad clínica particular porque reconocerán específicamente MASP-1, MASP-2 o MASP-3 humanas, pero no provocarán una respuesta inmunitaria en humanos contra el anticuerpo mismo. En consecuencia, son más adecuados para la administración *in vivo* en humanos, especialmente cuando es necesaria la administración

repetida o a largo plazo.

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados también son descritas, por ejemplo, por Jones, P.T., y col., *Nature* 321: 522, (1986); Carter, P., y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 4285, (1992); Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, (1992); Singer, I.I., y col., *J Immunol.* 150: 2844, (1993); Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., (1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland y colaboradores (eds.), John Wiley & Sons, Inc., páginas 399-434, (1996); y en la patente de Estados Unidos N° 5.693.762, de Queen, 1997. Además, existen entidades comerciales que sintetizarán anticuerpos humanizados de regiones de anticuerpos murinos específicos, tales como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

5

#### 10 vi. Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 también pueden prepararse usando métodos recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos humanos se pueden hacer usando bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (disponibles, por ejemplo, de Stratagene, Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos ( $V_H$ ,  $V_L$ , Fv, Factor D, Fab o  $F(ab')_2$ ). Estos fragmentos se usan luego para construir anticuerpos humanos completos usando técnicas similares a aquellas para producir anticuerpos quiméricos.

15

#### vii. Anticuerpos antiidiotípicos

Una vez que los anticuerpos MASP-1, MASP-2 o MASP-3 se identifican con la actividad inhibidora deseada, estos anticuerpos se pueden usar para generar anticuerpos anti-idiotipo que se asemejan a una porción de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3 usando técnicas que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greenspan, N.S., y col., *FASEB J.* 7: 437, (1993). Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a MASP-2 e inhiben competitivamente una interacción de proteína de la MASP-2 requerida para la activación del complemento pueden usarse para generar anti-idiotipos que se asemejan al sitio de unión de MBL en la proteína de la MASP-2 y por lo tanto se unen a un ligando de unión de la MASP-2 como, por ejemplo, MBL y lo neutralizan.

20

#### viii. Fragmentos de inmunoglobulina

Los agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3 útiles en el método de la invención abarcan no solo las moléculas de inmunoglobulina intactas, sino también los fragmentos bien conocidos que incluyen fragmentos Fab, Fab',  $F(ab)_2$ ,  $F(ab')_2$  y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos y triespecíficos) formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

25

Es bien sabido en la técnica que solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, participa en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, por ejemplo, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Las regiones pFc' y Fe del anticuerpo son efectores de la vía clásica del complemento pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual se ha escindido la región pFc' enzimáticamente, o que se ha producido sin la región pFc', se denomina fragmento  $F(ab')_2$  y retiene los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento aislado de  $F(ab')_2$  se denomina fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. De manera similar, un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fe, o que se ha producido sin la región Fe, se denomina fragmento Fab y retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

35

Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse mediante hidrólisis proteolítica, tal como mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina, para obtener un fragmento 5S denominado  $F(ab')_2$ . Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un tiol que reduce el agente para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática con pepsina produce dos fragmentos monovalentes de Fab y un fragmento de Fe directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. con el número 4.331.647 de Goldenberg; Nisonoff, A., y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, (1960); Porter, R.R., *Biochem. J.* 73: 119, (1959); Edelman, y colaboradores, En *Methods in Enzymology* 1: 422, Academic Press, (1967); y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

40

45

En algunos casos, se prefiere el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fe para evitar la activación de la vía clásica del complemento que se inicia al unirse Fe al receptor Fc $\gamma$ . Hay varios métodos por los cuales uno puede producir un anticuerpo monoclonal que evita las interacciones del receptor Fc $\gamma$ . Por ejemplo, la región Fe de un anticuerpo monoclonal se puede eliminar químicamente usando digestión parcial por enzimas proteolíticas (tales como digestión con ficina), generando, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos tales como los fragmentos Fab o  $F(ab)_2$  (Mariani, M., y col., *Mol. Immunol.*, 28: 69-71, (1991)). Alternativamente, el isotipo  $\gamma_4$  de IgG humana, que no se une a los receptores Fc $\gamma$ , puede usarse durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en este documento. Los anticuerpos, los anticuerpos

55

monocatenarios y los dominios de unión al antígeno que carecen del dominio Fe también se pueden diseñar usando técnicas recombinantes descritas en este documento.

#### ix. Fragmentos de anticuerpos monocatenarios

5 Alternativamente, se pueden crear moléculas de unión de cadena peptídica únicas específicas para MASP-1, MASP-2 o MASP-3 en las que están conectadas las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Los fragmentos Fv pueden estar conectados por un enlazador peptídico, para formar una proteína de unión al antígeno monocatenaria (scFv). Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una  
10 célula hospedadora, tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv se describen, por ejemplo, por Whitlow, y colaboradores, "Methods: A Companion to Methods in Enzymology", 2:97, (1991); Bird, y colaboradores, *Science* 242: 423, (1988); patente de los Estados Unidos núm. 4.946.778, de Ladner; Pack, P., y col., *Bio/Technology* 11: 1271, (1993).

15 Como un ejemplo ilustrativo, puede obtenerse un scFv específico de la MASP-3 exponiendo linfocitos al polipéptido de la MASP-3 *in vitro* y seleccionando bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de la proteína o del péptido inmovilizados o marcados de la MASP-3). Los genes que codifican polipéptidos que tienen dominios potenciales de unión a polipéptidos MASP-3 pueden obtenerse seleccionando bibliotecas de péptidos aleatorias mostradas en fagos o en bacterias tales como *E. coli*. Estas  
20 bibliotecas de presentación de péptidos al azar se pueden usar para detectar péptidos que interactúan con la MASP-3. Las técnicas para crear y seleccionar tales bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios son bien conocidas en la técnica (patente de los Estados Unidos número 5.223.409, de Lardner, Patente de los Estados Unidos número 4.946.778, de Ladner, Patente de los Estados Unidos número 5.403.484, de Lardner, Patente de los Estados Unidos número 5.571.698, Lardner, y Kay y colaboradores, *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc.,  
25 1996) y las bibliotecas y los kits de visualización de péptidos aleatorios para explorar tales bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, California), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA), y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo de la MASP-3 útil en este aspecto de la invención es un péptido que  
30 codifica una única región determinante de complementariedad (CDR), que se une a un epítipo en un antígeno MASP-3 e inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-3 (es decir, LEA-1). Otra forma de un fragmento de anticuerpo de la MASP-1 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR), que se une a un epítipo en un antígeno MASP-1 e inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-3 (es decir, LEA-1). Otra forma de un fragmento de anticuerpo de la MASP-2 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una única región determinante de  
35 complementariedad (CDR) que se une a un epítipo en un antígeno MASP-2 e inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-2 (es decir, LEA-2).

Los péptidos de la CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse construyendo genes que  
40 codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de las células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick y col., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 106, (1991), Courtenay-Luck, "Manipulación genética de anticuerpos monoclonales", en *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter y otros (eds.), Página 166, Cambridge University Press, (1995), y Ward y colaboradores, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch y otros (eds.), Página 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

45 Los anticuerpos de MASP descritos en la presente memoria descriptiva se administran a un sujeto que lo necesita para inhibir la activación del complemento por LEA-1, por LEA-2 o por una combinación de LEA-1 y LEA-2. En algunos casos, el agente inhibidor de la MASP es un anticuerpo monoclonal de MASP-1, MASP-2 o MASP-3 humano o humanizado de alta afinidad, con función efectora reducida.

#### x. Anticuerpos biespecíficos

50 Los agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3 útiles en el método de la invención abarcan anticuerpos multiespecíficos (es decir, biespecíficos y triespecíficos). Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Como se describió anteriormente y según se muestra en la tabla 2, en un caso, el método comprende el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una especificidad de unión para MASP-2 (por  
55 ejemplo, unión por lo menos a CCP1-CCP2 o al dominio de serina proteasa de la MASP-2, a uno de ellos) y una especificidad de unión para MASP-3 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de la MASP-3). En otro caso, el método comprende el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una especificidad de unión para MASP-1 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de la MASP-1) y una especificidad de unión para MASP-2 (por

ejemplo, unión por lo menos al dominio CCP1-CCP2 o a la serina proteasa de la MASP-2, a uno de ellos como mínimo). En otro caso, el método comprende el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una especificidad de unión para MASP-1 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de la MASP-1) y una especificidad de unión para MASP-3 (por ejemplo, unión a serina dominio de proteasa de la MASP-3). En otro caso, el método comprende el uso de un anticuerpo trispecífico que comprende una especificidad de unión para MASP-1 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de la MASP-1), una especificidad de unión para MASP-2 (por ejemplo, unión por lo menos al dominio CCP1-CCP2 o a la serina proteasa de la MASP-2, a uno de ellos como mínimo) y una especificidad de unión para MASP-3 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de la MASP-3).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos están dentro del alcance de los expertos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537-539 (1983)). Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión preferiblemente se produce con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que incluye al menos parte de las regiones bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles de los métodos ilustrativos actualmente conocidos para generar anticuerpos biespecíficos, véanse, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986); WO96/27011; Brennan y colaboradores, *Science* 229: 81 (1985); Shalaby y otros, *J Exp. Med.* 175: 217 - 225 (1992); Kostelny y col., *J. Immunol.* 148 (5): 1547 - 1553 (1992); Hollinger y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444 - 6448 (1993); Gruber y col., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994); y Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991). Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos entrecruzados o heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método conveniente de entrecruzamiento. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente de los EE. UU. N.º 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. (Véase, por ejemplo, Kostelny y colaboradores *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992)). La tecnología "diacuerpo", descrita por Hollinger y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444 - 6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. De acuerdo con esto, los dominios de VH y de VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos enteros biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse con facilidad y expresarse en el *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) con especificidades de unión apropiadas se pueden seleccionar fácilmente usando la presentación en fagos (WO94/13804) de las bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces se puede hacer una biblioteca donde se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad apropiada.

También se ha informado sobre otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena simple (scFv). (Véase, por ejemplo, Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales", como se describe en, por ejemplo, Zapata y colaboradores, *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 (1995). En pocas palabras, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos del Factor D en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Los métodos de la invención también abarcan el uso de formas variantes de anticuerpos biespecíficos, tales como las moléculas de inmunoglobulina de doble dominio tetravalentes (DVD-Ig) descritas en Wu y col., *Nat Biotechnol* 25: 1290-1297 (2007). Las moléculas de DVD-Ig se diseñan de manera que dos dominios variables de cadena ligera (VL) diferentes de dos anticuerpos parentales se enlacen en tándem directamente o mediante un conector corto, usando técnicas de ADN recombinante, seguido del dominio constante de cadena ligera. Los métodos para generar moléculas de DVD-Ig a partir de dos anticuerpos parentales se describen adicionalmente, por ejemplo, en los documentos de patente WO08/024188 y WO07/024715.

#### VI. Inhibidores no peptídicos

En algunos casos, el agente inhibidor de la MASP-3 o MASP-2 es un péptido inhibidor de la MASP-3 o MASP-2 o MASP-1 o un inhibidor no peptídico de la MASP-3 o de la MASP-2 o de la MASP -1. Los agentes inhibidores no peptídicos de la MASP pueden administrarse al sujeto sistémicamente, tal como mediante administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra parenteral, o mediante administración oral. El agente inhibidor de la MASP puede administrarse periódicamente, durante un lapso prolongado para el tratamiento o control de una afección crónica, o puede llevarse a cabo por administración única o repetida en el período anterior o posterior a haber sufrido un traumatismo o lesión aguda o durante el transcurso de dicho traumatismo lesión.

## VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de suministro

## Dosificación

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento dependiente de la MASP-3 en un sujeto que padece una enfermedad hemolítica, tal como la HPN, lo cual comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el método comprende, además, administrar una composición que comprende un agente inhibidor de la MASP-2. Los agentes inhibidores de la MASP-3 y MASP-2 pueden administrarse a un sujeto que lo necesite, a dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar las afecciones asociadas con la activación del complemento dependiente de la MASP-3 (LEA-1), y opcionalmente también MASP-2 activación del complemento dependiente (LEA-2). Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del agente inhibidor de la MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de la MASP-3 y un agente inhibidor de la MASP-2, suficiente para que mejoren los síntomas de la afección.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de la MASP-3 y MASP-2 pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar que emplean modelos animales experimentales. Usando tales modelos animales, el NOAEL (*non observed adverse effect level*, nivel sin efecto adverso observado) y la MED (*minimally effective dose*, dosis mínimamente efectiva) pueden determinarse usando métodos estándar. La relación de dosis entre los efectos NOAEL y MED es la relación terapéutica, que se expresa como la relación NOAEL/MED. Los agentes inhibidores de la MASP-3 y los agentes inhibidores de la MASP-2 que exhiben grandes índices o relaciones terapéuticos son los más preferidos. Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación del agente inhibidor de la MASP-3 y el agente inhibidor de la MASP-2 se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el MED con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada.

Para la formulación de cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse usando modelos animales. Por ejemplo, una dosis puede formularse en un modelo animal para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la MED. Los niveles cuantitativos del agente inhibidor de la MASP-3 o del agente inhibidor de la MASP-2 en plasma también se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Además de los estudios de toxicidad, la dosificación efectiva también puede estimarse basándose en la cantidad de proteína de la MASP diana presente en un sujeto vivo y la afinidad de unión del agente inhibidor de la MASP-3 o MASP-2.

Se ha informado que los niveles de la MASP-1 en sujetos humanos normales están presentes en el suero en niveles comprendidos en el intervalo de 1,48 a 12,83  $\mu\text{g/ml}$  (Terai I. y col., *Clin Exp Immunol* 110: 317-323 (1997); Theil y col., *Clin. Exp. Immunol.* 169: 38 (2012)). Se ha informado que las concentraciones séricas medias de la MASP-3 en sujetos humanos normales están en el intervalo de aproximadamente 2,0 a 12,9  $\mu\text{g/ml}$  (Skjoedt M y col., *Immunobiology* 215 (11): 921-31 (2010); Degn y colaboradores, *J. Immunol Methods*, 361-37 (2010); Csuka y colaboradores, *Mol. Immunol.* 54: 271 (2013). Se ha demostrado que los niveles de la MASP-2 en sujetos humanos normales están presentes en el suero en niveles bajos en el intervalo de 500  $\text{ng/ml}$ , y los niveles de la MASP-2 en un sujeto particular pueden determinarse usando un ensayo cuantitativo para MASP-2 descrito en Moller-Kristensen M., y col., *J. Immunol. Methods* 282: 159-167 (2003) y Csuka y colaboradores, *Mol. Immunol.* 54: 271 (2013).

Generalmente, la dosificación de las composiciones administradas que comprenden agentes inhibidores de la MASP-3 o agentes inhibidores de la MASP-2 varía dependiendo de factores tales como la edad del sujeto, su peso, altura, sexo, condición médica general e historial médico previo. Como ilustración, los agentes inhibidores de la MASP-3 o los agentes inhibidores de la MASP-2 (como los anticuerpos MASP-3, MASP-1 o MASP-2) pueden administrarse en intervalos de dosis de aproximadamente 0,010 a 100,0  $\text{mg/kg}$ , preferiblemente de 0,010 a 10  $\text{mg/kg}$ , preferiblemente de 0,010 a 1,0  $\text{mg/kg}$ , más preferiblemente de 0,010 a 0,1  $\text{mg/kg}$  del peso corporal del sujeto. En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-2 (tales como los anticuerpos MASP-2) se administran en intervalos de dosificación aproximados de 0,010 a 10  $\text{mg/kg}$  preferiblemente, con preferencia, de 0,010 a 1,0  $\text{mg/kg}$ , con mayor preferencia, de 0,010 a 0,1  $\text{mg/kg}$  del peso corporal del sujeto. En algunos casos, los agentes inhibidores de la MASP-1 (como los anticuerpos MASP-1) o los agentes inhibidores de la MASP-3 (como los anticuerpos MASP-3) se administran en intervalos de dosis de aproximadamente 0,010 a 100,0  $\text{mg/kg}$ , preferiblemente de 0,010 a 10  $\text{mg/kg}$ , preferiblemente de 0,010 a 1,0  $\text{mg/kg}$ , más preferiblemente de 0,010 a 0,1  $\text{mg/kg}$  del peso corporal del sujeto.

La eficacia terapéutica de las composiciones inhibidoras de la MASP-3, opcionalmente en combinación con composiciones inhibidoras de la MASP-2, o de composiciones inhibidoras de la MASP-1, opcionalmente en combinación con composiciones inhibidoras de la MASP-2, y los métodos de la presente invención en un sujeto

5 dado y con dosificaciones apropiadas, se puede determinar de acuerdo con ensayos de complemento bien conocidos por los expertos en la técnica. El complemento genera numerosos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado ensayos sensibles y específicos que están disponibles comercialmente para la mayoría de estos productos de activación, incluidos los pequeños fragmentos de activación C3a, C4a y C5a y los grandes fragmentos de activación iC3b, C4d, Bb y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reaccionan con nuevos antígenos (neoantígenos) expuestos en el fragmento, pero no en las proteínas nativas de las que se forman, lo que hace que estos ensayos sean muy simples y específicos. La mayoría se basa en la tecnología ELISA, aunque el radioinmunoensayo todavía se usa a veces para C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos 'desArg', que son las principales formas encontradas en la circulación. Los fragmentos no procesados y C5a<sub>desArg</sub> se eliminan rápidamente uniéndose a los receptores de la superficie celular y, por lo tanto, están presentes en concentraciones muy bajas, mientras que C3a<sub>desArg</sub> no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador sensible, independiente de la vía de activación del complemento. La activación de la vía alternativa puede evaluarse midiendo el fragmento Bb y/o midiendo la activación del factor D. La detección del producto en fase fluida de la activación de la vía de ataque a la membrana, sC5b-9, proporciona evidencia de que el complemento se está activando hasta su finalización. Dado que tanto la vía de la lectina como clásica generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no proporciona ninguna información sobre cuál de estas dos vías ha generado los productos de activación.

20 La inhibición de la activación del complemento dependiente de la MASP-3 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento, que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de la MASP-3 de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de la activación del complemento mediada por el LEA-1 (inhibición de la hemólisis y la opsonización); la inhibición de la escisión específica de sustrato de la serina proteasa de MASP-3, la reducción de la hemólisis (medida, por ejemplo como se describe en el ejemplo 5) o la reducción de la escisión de C3 y del depósito de C3b (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 o Ejemplo 11).

30 La inhibición de la activación del complemento dependiente de la MASP-2 se caracteriza por al menos uno de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento, que se produce como resultado de la administración de un agente inhibidor de la MASP-2 de acuerdo con los métodos de la invención: la inhibición de la generación o producción de los productos del sistema de activación del complemento dependiente de la MASP-2 C4b, C3a, C5a y/o C5b-9 (MAC) (medido, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 2 de la Patente de Estados Unidos N.º 7.919.094), la reducción de la escisión de C4 y el depósito de C4b (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 8 o en el ejemplo 9) o la reducción de la escisión de C3 y el depósito de C3b (medida, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 11).

#### I. Portadores farmacéuticos y vehículos para el suministro

35 En general, las composiciones de agentes inhibidores de la MASP-3 y las composiciones de agentes inhibidores de la MASP-2 de la presente invención o las composiciones que comprenden una combinación de agentes inhibidores de la MASP-2 y MASP-3, pueden combinarse con cualquier otro agente terapéutico seleccionado y están contenidas de un modo adecuado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo no es tóxico, es biocompatible y se selecciona de modo tal que no afecte de un modo negativo la actividad biológica del agente inhibidor de la MASP-3 o del agente inhibidor de la MASP-2 (y cualquier otro agente terapéutico combinado con el mismo). Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables para péptidos se describen en la patente de los Estados Unidos con el número 5.211.657 de Yamada. Los anticuerpos MASP útiles en la invención, como se describe en este documento, pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, en gel, líquidas o gaseosas tales como en comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, depósitos, inhalantes e inyecciones que permitan la administración oral, parenteral o quirúrgica. La descripción también contempla la administración local de las composiciones mediante el recubrimiento de dispositivos médicos y similares.

50 Los portadores adecuados para la administración parenteral, por vía inyectable, infusión o irrigación y tópica incluyen agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer normal o láctica, solución de dextrosa, solución de Hank o propandiol. Además, se pueden emplear aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite biocompatible que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de productos inyectables. El vehículo y el agente se pueden combinar como un líquido, una suspensión, un gel, una pasta o un ungüento polimerizable o no polimerizable.

55 El transportador también puede comprender un vehículo de suministro para sostener (es decir, extender, retrasar o regular) la administración del agente o de los agentes o para mejorar la administración, absorción, estabilidad o farmacocinética del o de los agentes terapéuticos. Tal vehículo de administración puede incluir, a modo de ejemplo no limitativo, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copolímeros y micelas poliméricas. Los sistemas de administración de hidrogel y micela adecuados incluyen los copolímeros PEO: PHB:PEO y los complejos copolímero/ciclodextrina descritos en el documento de patente WO 2004/009664 A2 y los

complejos PEO y PEO/ciclodextrina descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles pueden inyectarse localmente en el sitio de la acción prevista, o por vía subcutánea o intramuscular para formar un depósito de liberación sostenida.

5 Las composiciones de la presente invención se pueden formular para la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial o como inhalante.

Para la administración intraarticular, el agente inhibidor de la MASP-3 o el agente inhibidor de la MASP-2 puede incluirse en los portadores líquidos o en gel que antes descritos que son inyectables, en los vehículos de suministro con liberación sostenida descritos anteriormente, que son inyectables o en un ácido hialurónico o derivado de ácido hialurónico.

10 Para la administración oral de agentes no peptidérgicos, el agente inhibidor de la MASP-3 o el agente inhibidor de la MASP-2 pueden incluirse en una carga inerte o diluyente, tales como sacarosa, almidón de soja o celulosa.

Para la administración tópica, el agente inhibidor de la MASP-3 o agente inhibidor de la MASP-2 puede incluirse en un ungüento, una loción, una crema, un gel, en gotas, en supositorios, en *spray*, en forma líquida o de polvo, o en sistemas de administración de gel o microcapsulares por medio de un parche transdérmico.

15 Se están desarrollando varios sistemas de administración nasal y pulmonar, que incluyen aerosoles, inhaladores de dosis medidas, inhaladores de polvo seco y nebulizadores, y se pueden adaptar adecuadamente para la administración de la presente invención en un aerosol, inhalante o vehículo de administración nebulizado, respectivamente.

20 Para la administración intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), se pueden usar sistemas de administración estériles de un modo apropiado (por ejemplo, líquidos, geles, suspensiones, etc.) para administrar la presente invención.

Las composiciones de la presente invención también pueden incluir excipientes biocompatibles, tales como agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión, diluyentes, tampones, potenciadores de la penetración, emulsionantes, aglutinantes, espesantes, agentes aromatizantes (para administración oral).

25 ii. Portadores farmacéuticos para anticuerpos y péptidos

Más específicamente con respecto a los anticuerpos de la MASP, como se describe aquí, las formulaciones ejemplares pueden administrarse por vía parenteral como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión del compuesto, en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido y estéril —tales como agua, aceites, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares presentes en las composiciones que comprenden los anticuerpos de la MASP. Los componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas incluyen petróleo (por ejemplo, de origen animal, vegetal o sintético), por ejemplo, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son vehículos líquidos preferidos para soluciones inyectables.

35 Los anticuerpos MASP también se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil de los agentes activos.

#### VIII. Modos de administración

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes inhibidores de la MASP-3 o agentes inhibidores de la MASP-2 se pueden administrar de varias maneras, dependiendo de si el modo local o sistémico de administración es el más apropiado para la afección que se está tratando. Además, las composiciones de la presente invención pueden administrarse recubriendo con las composiciones un dispositivo médico implantable o incorporándolas en él.

##### i. Suministro sistémico

45 Tal como se usa en el presente documento, las frases “suministro sistémico” y “administración sistémica” incluyen, entre otras, las vías orales y parenterales, que comprenden las vías intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intraarterial, inhalatoria, sublingual, bucal y tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal y otras vías de administración, que efectivamente dan como resultado la dispersión del agente administrado a un sitio único o múltiple de la acción terapéutica deseada. Las vías preferidas de administración sistémica para las presentes composiciones incluyen intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial e inhalatoria. Se apreciará que la vía de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizados en las composiciones particulares de la  
50 presente invención se determinará en parte teniendo en cuenta la susceptibilidad del agente a las vías de transformación metabólica asociadas con una vía de administración dada. Por ejemplo, la manera más adecuada de administrar los agentes peptidérgicos es cualquiera que no sea la oral.

Los anticuerpos inhibidores de la MASP, como se describen en el presente documento, pueden administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier medio adecuado. Los métodos de administración de anticuerpos y polipéptidos MASP incluyen administración por vía oral, pulmonar, parenteral (por ejemplo, Inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), por inhalación (como a través de una formulación de polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o las vías de administración sublinguales, y pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración.

A modo de ejemplo representativo, se pueden introducir anticuerpos y péptidos inhibidores de la MASP en un cuerpo vivo por aplicación a una membrana corporal capaz de absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasal, gastrointestinal y rectal. Los polipéptidos se aplican típicamente a la membrana de absorción junto con un potenciador de la permeación. (Véase, por ejemplo, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, (1988); Lee, V.H.L., *J. Controlled Release* 13: 213, (1990); Lee, V.H.L., Ed., *Peptide y Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, Nueva York (1991); DeBoer, AG, y col., *J. Controlled Release* 13: 241, (1990). Por ejemplo, STDHF es un derivado sintético de ácido fusídico, un tensioactivo esteroide que es de estructura similar a las sales biliares, y se ha utilizado como potenciador de la permeación para la administración nasal (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dic. 1990).

Los anticuerpos inhibidores de la MASP como se describen en este documento pueden introducirse en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, la unión covalente de polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), se ha usado para proteger ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y así prolongar la semivida (Fuertges, F., y col., *J. Controlled Release* 11: 139, (1990)). Se han informado muchos sistemas poliméricos para la administración de proteínas (Bae, Y.H., y col., *J. Controlled Release* 9: 271, (1989); Hori, R., y col., *Pharm. Res.* 6: 813, (1989); Yamakawa, I., y col., *J. Pharm. Sci.* 79: 505, (1990); Yoshihiro, I., y col., *J. Controlled Release* 10: 195, (1989); Asano, M., y colaboradores, *J. Controlled Release* 9: 111, (1989); Rosenblatt, J., y col., *J. Controlled Release* 9: 195, (1989); Makino, K., *J. Controlled Release* 12: 235, (1990); Takakura, Y., y col., *J. Pharm. Sci.* 78: 117, (1989); Takakura, Y., y col., *J. Pharm. Sci.* 78: 219, (1989)).

Recientemente, se han desarrollado liposomas con mejor estabilidad en suero y semividas de circulación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos número 5.741.516, de Webb). Además, se han revisado diversos métodos de liposomas y preparaciones similares a liposomas como posibles portadores de fármacos (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos número 5.567.434, de Szoka, la patente de Estados Unidos número 5.552.157, de Yagi, la patente de Estados Unidos número 5.565.213, de Nakamori; la patente número 5.738.868 de Shinkarenko y la patente de los Estados Unidos número 5.795.587 de Gao).

Para aplicaciones transdérmicas, los anticuerpos inhibidores de la MASP, como se describen en este documento, pueden combinarse con otros ingredientes adecuados, tales como vehículos y/o adyuvantes. No existen limitaciones sobre la naturaleza de tales otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables para su administración prevista, y no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos inhibidores de la MASP también pueden impregnarse en parches transdérmicos, emplastos y vendajes, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar sistémicamente de forma periódica a intervalos determinados, para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse, tal como mediante inyección subcutánea, cada dos a cuatro semanas o a intervalos menos frecuentes. Será el médico quien determine el régimen de dosificación, teniendo en cuenta diversos factores que pueden influir en la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán el grado de avance de la afección que se está tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y otros factores clínicos. La dosificación para cada agente individual variará en función del agente inhibidor de la MASP-3 o del agente inhibidor de la MASP-2 que se incluye en la composición, así como de la presencia y naturaleza de cualquier vehículo para el suministro del fármaco (por ejemplo, un vehículo de suministro de liberación sostenida). Además, la cantidad de dosificación puede ajustarse para tener en cuenta la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético del agente o de los agentes administrados.

## ii. Suministro local

Tal como se usa en este documento, el término "local" abarca la aplicación de un fármaco en un sitio de acción localizada deseada o alrededor de este, y puede incluir, por ejemplo, la administración tópica a la piel o a otros tejidos afectados, la administración oftálmica, intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), la administración intraarticular, intracavitaria, intracraneal o intravesicular, colocación o irrigación. Puede preferirse la administración local para permitir la administración de una dosis más baja, a fin de evitar los efectos secundarios sistémicos, y para un control más preciso del tiempo de administración y la concentración de los agentes activos en el sitio de administración local. La administración local proporciona una concentración conocida en el sitio objetivo, independientemente de la variabilidad interpaciente en el metabolismo, el flujo sanguíneo, etc. El modo directo de administración también proporciona un mejor control de la dosificación.

La administración local de un agente inhibidor de la MASP-3 o un agente inhibidor de la MASP-2 se puede lograr en el contexto de métodos quirúrgicos para tratar una enfermedad o afección, como por ejemplo durante procedimientos como cirugía de derivación arterial, aterectomía, procedimientos láser, ultrasonidos, procedimientos, angioplastia con balón y colocación de *stent*. Por ejemplo, se puede administrar un agente inhibidor de la MASP-3 o un agente inhibidor de la MASP-2 a un sujeto junto con un procedimiento de angioplastia con balón. Un procedimiento de angioplastia con balón implica insertar un catéter que tiene un balón desinflado en una arteria. El balón desinflado se coloca cerca de la placa aterosclerótica y se infla de manera que la placa se comprima contra la pared vascular. Como resultado, la superficie del balón está en contacto con la capa de células endoteliales vasculares en la superficie del vaso sanguíneo. El agente inhibidor de la MASP-3 o agente inhibidor de la MASP-2 se puede unir al catéter de angioplastia con balón de una manera que permita la liberación del agente en el sitio de la placa aterosclerótica. El agente se puede unir al catéter de balón de acuerdo con procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente puede almacenarse en un compartimento del catéter de balón hasta que se infla el globo, en cuyo punto se libera en el entorno local. Alternativamente, el agente puede impregnarse en la superficie del balón, de manera que contacte las células de la pared arterial a medida que se infla el balón. El agente también puede suministrarse en un catéter de balón perforado, tal como los descritos en Flugelman, M.Y., y col., *Circulation* 85: 1110-1117, (1992). Véase también la solicitud PCT publicada WO 95/23161 para interiorizarse un procedimiento ejemplar para unir una proteína terapéutica a un catéter de angioplastia con balón. Asimismo, el agente inhibidor de la MASP-3 o agente inhibidor de la MASP-2 puede incluirse en un gel o revestimiento polimérico aplicado a un *stent*, o puede incorporarse en el material del *stent*, de manera que el *stent* eluya el agente inhibidor de la MASP-3 o el agente inhibidor de la MASP-2 después de la colocación vascular.

Los agentes inhibidores de la MASP-3 o los agentes inhibidores de la MASP-2 utilizados en el tratamiento de artritis y otros trastornos musculoesqueléticos pueden administrarse localmente mediante inyección intraarticular. Dichas composiciones pueden incluir adecuadamente un vehículo de administración de liberación sostenida. Como un ejemplo adicional de instancias en las que puede desearse la administración local, las composiciones inhibidoras de la MASP-2 usadas en el tratamiento de afecciones urogenitales pueden instilarse de un modo adecuado intravesicalmente o dentro de otra estructura urogenital.

#### IX. Regímenes de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible de padecer HPN o que de otra manera corre el riesgo de padecerla, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo de desarrollar síntomas del trastorno. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto del que se sospecha que padece o que ya padece, HPN en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar, o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En un caso, los glóbulos rojos del sujeto se opsonizan mediante fragmentos de C3 en ausencia de la composición, y la administración de la composición al sujeto aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto. En un caso, en ausencia de la composición, el sujeto exhibe uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: (i) niveles inferiores a los niveles normales de hemoglobina, (ii) niveles inferiores a los niveles normales de plaquetas; (iii) niveles superiores a los niveles normales de reticulocitos y (iv) niveles superiores a los niveles normales de bilirrubina, y la administración de la composición al sujeto mejora al menos uno o más de los síntomas, lo cual deriva en (i) niveles mayores, normales o casi normales de hemoglobina (ii) niveles mayores, normales o casi normales de plaquetas, (iii) niveles menores, normales o casi normales de reticulocitos y/o (iv) niveles menores, normales o casi normales de bilirrubina.

Tanto en regímenes profilácticos como terapéuticos, las composiciones que comprenden agentes inhibidores de la MASP-3 y opcionalmente agentes inhibidores de la MASP-2 se pueden administrar en varias dosis hasta que se haya logrado un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. El agente inhibidor de la MASP-3 y/o MASP-2 comprende un anticuerpo de la MASP-1, un anticuerpo de la MASP-2 o un anticuerpo de la MASP-3, que se pueden administrar adecuadamente a un paciente adulto (por ejemplo, un peso promedio adulto de 70 kg) en una dosificación de 0,1 mg a 10,000 mg, más adecuadamente de 1,0 mg a 5,000 mg, más adecuadamente, de 10,0 mg a 2,000 mg, más adecuadamente de 10,0 mg a 1,000 mg y aún más adecuadamente, de 50,0 mg a 500 mg, o de 10 a 200 mg. Para pacientes pediátricos, la dosis puede ajustarse en proporción al peso del paciente.

La aplicación de las composiciones inhibitorias de la MASP-3 y las composiciones inhibidoras de la MASP-2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una única composición que comprenda agentes inhibidores de la MASP-2 y de MASP-3 o agentes inhibidores biespecíficos o duales, o la administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de la HPN. De un modo alternativo, la composición se puede administrar a intervalos periódicos tales como de manera diaria, dos veces por semana, una vez por semana, semanas por medio, mensual o bimestral, durante un período prolongado para el tratamiento de la HPN.

En algunos casos, una primera composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se administran a un sujeto que padece HPN. En un caso, la primera composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y una

segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se administran simultáneamente (es decir, con un intervalo entre ellas de no más de 15 minutos aproximadamente o menos, tal como no mayor que 10, 5 o 1 minutos). En un caso, la primera composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se administran secuencialmente (es decir, la primera composición se administra antes o después de la administración de la segunda composición, en donde el intervalo en el tiempo de administración supera los 15 minutos). En algunos casos, la primera composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se administran concurrentemente (es decir, el período de administración de la primera composición se solapa con la administración de la segunda composición) Por ejemplo, en algunos casos, la primera composición y/o la segunda composición se administran durante un período de al menos una, dos, tres o cuatro semanas o más. En un caso, al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se combinan en una forma de dosificación unitaria. En un caso, una primera composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-3 y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de la MASP-2 se envasan juntas en un kit, para usar en el tratamiento de la HPN.

En algunos casos, el sujeto que padece HPN se ha sometido o está sometido actualmente a un tratamiento con un inhibidor terminal del complemento, que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5. En algunos casos, el método comprende administrar al sujeto una composición de la invención que comprende un MASP-3 y opcionalmente un inhibidor de la MASP-2 y administrar adicionalmente al sujeto un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína de complemento C5. En algunos casos, el inhibidor terminal del complemento es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunos casos, el inhibidor terminal del complemento es eculizumab.

### X. Ejemplos

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran el mejor modo contemplado ahora para llevar la invención a la práctica.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que los ratones con deficiencia en MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por *Neisseria meningitidis* después de la infección con el serogrupo A de *N. meningitidis* o con el serogrupo B del *N. meningitidis*.

#### Métodos:

Se generaron ratones MASP-2 *knockout* (ratones MASP-2 KO), como se describe en el ejemplo 1 del documento de patente de los EE. UU. con el número US 7.919.094. Los ratones MASP-2 KO de 10 semanas (n = 10) y ratones del tipo salvaje (WT, *wild-type*) C57/BL6 (n = 10) se inocularon por inyección intraperitoneal (i.p.) con una dosis de  $2,6 \times 10^7$  CFU de *N. meningitidis* serogrupo A Z2491 en un volumen de 100  $\mu$ l. La dosis infecciosa se administró a los ratones junto con dextrano de hierro, a una concentración final de 400 mg/kg. La supervivencia de los ratones después de la infección se controló durante un período de 72 horas.

En un experimento separado, se inocularon ratones MASP-2 KO de 10 semanas (n = 10) y ratones WT C57/BL6 (n = 10) por inyección i.p. con una dosis de  $6 \times 10^6$  CFU de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* en un volumen de 100  $\mu$ l. La dosis infecciosa se administró a los ratones junto con dextrano de hierro, a una dosis final de 400 mg/kg. La supervivencia de los ratones después de la infección se controló durante un período de 72 horas. También se determinó el puntaje de enfermedad para los ratones WT y MASP-2 KO durante el período de 72 horas después de la infección, sobre la base de los parámetros de puntuación de la enfermedad que se describen a continuación, en la tabla 4, basada en el esquema de Fransen y colaboradores (2010) con ligeras modificaciones.

Tabla 4: puntaje de la enfermedad asociado con los signos clínicos en ratones infectados

Signos	Puntajes
Normal	0
Pelaje levemente erizado	1
Pelaje erizado, ojos lentos y pegajosos	2
Pelaje erizado, aletargado y ojos cerrados	3
Muy enfermo y no se mueve después de la estimulación	4

Signos	Puntajes
Muerto	5

Se tomaron muestras de sangre de los ratones a intervalos de una hora después de la infección y se analizaron para determinar el nivel sérico (log cfu/ml) de *N. meningitidis*, con el fin de verificar la infección y determinar la tasa de eliminación de las bacterias del suero.

#### 5 Resultados:

La figura 8 es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de  $2,6 \times 10^7$  CFU de *N. meningitidis* serogrupo A Z2491. Tal como se muestra en la figura 8, el 100 % de los ratones MASP-2 KO sobrevivieron durante el período de 72 horas, después de la infección. Por el contrario, solo el 80 % de los ratones WT ( $p = 0,012$ ) seguían vivos 24 horas después de la infección, y solo el 50 % de los ratones WT seguían vivos a las 72 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones con deficiencia de la MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por *N. meningitidis* del serogrupo A Z2491.

La figura 9 es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de  $6 \times 10^6$  CFU de cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la figura 9, el 90 % de los ratones MASP-2 KO sobrevivieron durante el período de 72 horas después de la infección. Por el contrario, solo el 20 % de los ratones WT ( $p = 0,0022$ ) seguían con vida 24 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones con deficiencia de la MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*.

La figura 10 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* recuperada en diferentes momentos en muestras de sangre tomadas de los ratones MASP-2 KO y WT después de infección i.p. con  $6 \times 10^6$  CFU de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* ( $n = 3$  en diferentes momentos para ambos grupos de ratones). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SEM. Tal como se muestra en la figura 10, en ratones WT, el nivel de *N. meningitidis* en la sangre alcanzó un pico de aproximadamente 6,0 log cfu/ml 24 horas después de la infección y disminuyó a aproximadamente 4,0 log cfu/ml 36 horas después de la infección. Por el contrario, en los ratones MASP-2 KO, el nivel de *N. meningitidis* alcanzó un pico de aproximadamente 4,0 log cfu/ml a las 12 horas después de la infección y disminuyó a aproximadamente 1,0 log cfu/ml 36 horas después de la infección (el símbolo “\*” indica  $p < 0,05$ ; el símbolo “\*\*” indica  $p = 0,0043$ ). Estos resultados demuestran que aunque los ratones MASP-2 KO se infectaron con la misma dosis de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis* que los ratones WT, los ratones MASP-2 KO denotaron una mejor depuración de la bacteriemia, en comparación con los WT.

La figura 11 ilustra esquemáticamente el puntaje promedio de enfermedad de ratones MASP-2 KO y WT a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la infección con  $6 \times 10^6$  cfu de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*. Tal como se muestra en la figura 11, los ratones con deficiencia en MASP-2 mostraron una alta resistencia a la infección, con puntajes de la enfermedad mucho menores a las 6 horas (el símbolo “\*\*” indica  $p = 0,0411$ ), 12 horas (el símbolo “\*\*\*” indica  $p = 0,0049$ ) y 24 horas (el símbolo “\*\*\*\*” indica  $p = 0,0049$ ) después de la infección, en comparación con los ratones WT. Los resultados en la Figura 11 se expresan como medias  $\pm$  SEM.

En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran que los ratones con deficiencia de la MASP-2 están protegidos contra la mortalidad inducida por *N. meningitidis* después de la infección con serogrupo A de *N. meningitidis* o serogrupo B del *N. meningitidis*.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que la administración de anticuerpo de la MASP-2 después de la infección con *N. meningitidis* aumenta la supervivencia de los ratones infectados con *N. meningitidis*.

#### Antecedentes/justificación:

Como se describe en el ejemplo 24 de la patente de Estados Unidos 7.919.094, la proteína de la MASP-2 de rata se utilizó para preparar una biblioteca de presentación de fagos Fab, de la cual se identificó Fab2 # 11 como un anticuerpo funcionalmente activo. Los anticuerpos de longitud completa de los isotipos IgG2c de rata e IgG2a de ratón se generaron a partir del Fab2 # 11. El anticuerpo de la MASP-2 de longitud completa del isotipo IgG2a de ratón se caracterizó por parámetros farmacodinámicos (como se describe en el ejemplo 38 de la patente de los Estados Unidos 7.919.094).

En este ejemplo, el anticuerpo de longitud completa MASP-2 de ratón derivado de Fab2 # 11 se analizó en el modelo de ratón de infección por *N. meningitidis*.

Métodos:

5 El isotipo de anticuerpo de la MASP-2 de IgG2a de longitud completa de ratón, derivado de Fab2 # 11, generado como se describió anteriormente, se probó en el modelo de ratón de infección por *N. meningitidis* de la siguiente manera.

1. Administración de anticuerpos monoclonales (MoAb) de la MASP-2 de ratón después de la infección

10 Unos ratones Charles River C57/BL6 de 9 semanas de edad fueron tratados con el anticuerpo inhibidor de la MASP-2 de ratón (1,0 mg/kg) (n = 12) o anticuerpo de isotipo control (n = 10) a las 3 horas después i.p. inyección con una dosis alta ( $4 \times 10^6$  CFU) de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*.

Resultados:

15 La figura 12 es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra esquemáticamente el porcentaje de supervivencia de los ratones después de la administración de una dosis infecciosa de  $4 \times 10^6$  cfu de la cepa MC58 del serogrupo B del *N. meningitidis*, seguida de la administración 3 horas después de la infección del anticuerpo inhibidor de la MASP-2 (1,0 mg/kg) o del anticuerpo de isotipo de control. Tal como se muestra en la figura 12, el 90 % de los ratones tratados con el anticuerpo de la MASP-2 sobrevivieron durante el período de 72 horas después de la infección. Por el contrario, solo el 50 % de los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo sobrevivió durante el período de 72 horas después de la infección. El símbolo “\*” indica  $p = 0,0301$ , según lo determinado por la comparación de las dos curvas de supervivencia.

20 Estos resultados demuestran que la administración de un anticuerpo de la MASP-2 es eficaz para tratar y mejorar la supervivencia en sujetos infectados con *N. meningitidis*.

25 Como se demuestra en este documento, el uso del anticuerpo de la MASP-2 en el tratamiento de un sujeto infectado con *N. meningitidis* es eficaz cuando se administra dentro de las 3 horas posteriores a la infección, y se espera que sea efectivo dentro de las 24 horas a 48 horas posteriores a la infección. La enfermedad meningocócica (ya sea meningococemia o meningitis) es una emergencia médica y por lo general, la terapia se inicia de inmediato ante la sospecha de enfermedad meningocócica (es decir, antes de que se identifique positivamente al *N. meningitidis* como el agente etiológico).

30 En vista de los resultados en el ratón MASP-2 KO que se demostraron en el ejemplo 1, se cree que la administración del anticuerpo de la MASP-2 antes de la infección con *N. meningitidis* también sería eficaz para prevenir o mejorar la gravedad de la infección.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que la muerte dependiente del complemento del *N. meningitidis* en el suero humano depende de la MASP-3.

Justificación:

35 Los pacientes con menores niveles séricos de MBL funcional exhiben una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes (Kilpatrick y col., *Biochim Biophys Acta* 1572: 401-413 (2002)). Se sabe que la MBL reconoce al *N. meningitidis*, y se ha demostrado que los sueros con deficiencia en MBL no lisan al *N. meningitidis*.

40 En vista de los resultados descritos en los ejemplos 1 y 2, se llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar la eficacia de la administración de anticuerpo de la MASP-2, con el fin de tratar la infección por *N. meningitidis* en sueros humanos de control y con deficiencia en complemento. Los experimentos se realizaron en una alta concentración de suero (20 %), con el fin de preservar la vía del complemento.

Métodos:

45 I. Actividad bactericida sérica en diversos sueros humanos con deficiencia en complemento y en sueros humanos tratados con el anticuerpo humano MASP-2

En este experimento se usaron los siguientes sueros humanos de control y sueros con deficiencia en complemento:

Tabla 5: muestras de suero humano testeadas (tal como se muestra en la figura 13)

Muestra	Tipo de suero
A	Suero humano normal (NHS, <i>normal human serum</i> ) + Ab de la MASP-2 humano
B	NHS + Ab de control isotípico
C	MBL -/- suero humano
D	NHS
E	NHS inactivado por calor (HI, <i>Heat-Inactivated</i> )

5 Se aisló un anticuerpo recombinante contra la MASP-2 humana a partir de una Biblioteca combinatoria de anticuerpos (., A., y col., *J Mol. Biol.* 296: 57-86 (2000)), usando la MASP-2A humana recombinante como antígeno (Chen, C.B. y Wallis, *J. Biol. Chem.* 276: 25894 - 25902 (2001)). Se identificó un fragmento de scFv antihumano que inhibía con mucha potencia la activación de C4 y C3 mediada por la vía de la lectina en el plasma humano (IC50~20 nM) y que se convertía en un anticuerpo IgG4 humano de longitud completa.

10 El serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* se incubó con los diferentes sueros mostrados en la tabla 5, cada uno a una concentración sérica del 20 %, con o sin la adición de anticuerpo inhibidor de la MASP-2 humana (3 µg en 100 µl de volumen total) a 37 °C con agitación. Las muestras se tomaron en los siguientes momentos: intervalos de 0, 30, 60 y 90 minutos, se retiraron de las placas y luego se determinaron los recuentos viables. El suero humano inactivado por calor se usó como control negativo.

Resultados:

15 La figura 13 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis*, recuperado en diferentes momentos, en las muestras de suero humano detalladas en la tabla 5. La tabla 6 proporciona los resultados de la prueba t de Student para la figura 13.

Tabla 6: resultados de la prueba t de Student para la figura 13 (punto temporal: 60 minutos)

	Dif. de media (Log)	¿Significativa? ¿P<0,05?	Resumen de valores P
A frente a B	-0,3678	Sí	***(0,0002)
A frente a C	-1,1053	Sí	***(p<0,0001)
A frente a D	-0,2111	Sí	** (0,0012)
C frente a D	1,9	Sí	***(p<0,0001)

20 Tal como se muestra en la figura 13 y en la tabla 6, la destrucción dependiente del complemento de *N. meningitidis* en suero humano al 20 % se mejoró significativamente mediante la adición del anticuerpo inhibidor de la MASP-2 humana.

## 2. Actividad bactericida sérica en diversos sueros humanos con deficiencia en complemento

En este experimento, se usaron los siguientes sueros humanos de control y sueros humanos con deficiencia en complemento:

Tabla 7: muestras de suero humano probadas (como se muestra en la figura 14)

Muestra	Tipo de suero
A	Suero humano normal (NHS)
B	NHS inactivado por calor

Muestra	Tipo de suero
C	MBL -/-
D	MASP-3 -/- (MASP-1 +)

Nota: el suero MASP-3 -/- (MASP-1 +) en la muestra D se tomó de un sujeto con síndrome 3MC, que es un término unificador para los síndromes de Carnevale, Mingarelli, Malpuech y Michels superpuestos. Como se describe adicionalmente en el ejemplo 4, las mutaciones en el exón 12 del gen MASP-1/3 convierten el dominio de serina proteasa de la MASP-3, pero no en el MASP-1 disfuncional. También se sabe que el factor D está intacto en el suero de 3MC.

Se incubó el serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* con diferentes sueros humanos con deficiencia en complemento, cada uno a una concentración sérica del 20 %, a 37 °C con agitación. Se tomaron muestras en los siguientes momentos: intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, se colocaron en placas y luego se determinaron los recuentos viables. El suero humano inactivado por calor se usó como control negativo.

Resultados:

La figura 14 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 del *N. meningitidis* recuperados en diferentes momentos en las muestras de suero humano que se presentan en la tabla 7. Tal como se muestra en la figura 14, el suero de WT (NHS) tiene el nivel más alto de actividad bactericida para *N. meningitidis*. Por el contrario, los sueros humanos MBL -/- y MASP - 3 -/- (que tiene suficiencia de MASP-1) no tienen ninguna actividad bactericida. Estos resultados indican que la muerte de *N. meningitidis* dependiente del complemento en suero humano al 20 % (v/v) es dependiente de la MASP-3 y de la MBL. La tabla 8 proporciona los resultados de la prueba t de Student para la figura 14.

Tabla 8: resultados de la prueba t de Student para la figura 14

Comparación	Punto temporal (min)	Dif de media (Log)	¿Significativa? ¿P<0,05?	Resumen de valores P
A frente a B	60	-0,8325	Sí	***(p<0,0001)
A frente a B	90	-1,600	Sí	***(p<0,0001)
A frente a C	60	-1,1489	Sí	***(p<0,0001)
A frente a C	90	-1,822	Sí	***(p<0,0001)
A frente a D	60	-1,323	Sí	***(0,0005)
A frente a D	90	-2,185	Sí	***(p<0,0001)

En resumen, los resultados presentados en la figura 14 y en la tabla 8 demuestran que la destrucción de *N. meningitidis* dependiente del complemento en suero humano al 20 % es dependiente de la MASP-3 y MBL.

3. Muerte dependiente del complemento del *N. meningitidis* en sueros de ratones con deficiencia en MASP-2, MASP-1/3 al 20 % (v/v) o MBL A/C.

En este experimento, se usaron los siguientes sueros de ratón con déficit de complemento y sueros de ratón de control:

Tabla 9: muestras de suero de ratón probadas (como se muestra en la figura 15)

Muestra	Tipo de suero
A	WT
B	MASP-2 -/-

Muestra	Tipo de suero
C	MASP-1/3 -/-
D	MBL A/C -/-
E	WT, inactivado por calor (HIS)

5 Se incubó el serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* con diferentes sueros de ratones con deficiencia en complemento, cada uno a una concentración sérica del 20 %, a 37 °C, con agitación. Las muestras se tomaron en los siguientes momentos: intervalos de 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, se colocaron en placas y luego se determinaron los recuentos viables. El suero humano inactivado por calor se usó como control negativo.

Resultados:

10 La figura 15 ilustra esquemáticamente el log cfu/ml de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 del *N. meningitidis*, recuperado en diferentes momentos, en las muestras de suero de ratón detalladas en la tabla 9. Tal como se muestra en la figura 15, los sueros de ratón MASP-2 -/- tienen un mayor nivel de actividad bactericida para *N. meningitidis* que los sueros de ratón WT. Por el contrario, los sueros de ratón MASP-1/3 -/- no tienen ninguna actividad bactericida. El símbolo “\*\*” indica  $p = 0,0058$ , el símbolo “\*\*\*” indica  $p = 0,001$ . La tabla 10 proporciona los resultados de la prueba t de Student para la figura 15.

Tabla 10: resultados de la prueba t de Student para la figura 15

Comparación	Punto temporal (min)	Dif de media (Log)	¿Significativa? ¿ $P < 0,05$ ?	Resumen de valores P
A frente a B	60 min.	0,39	Sí	** (0,0058)
A frente a B	90 min.	0,6741	Sí	*** (0,001)

15 En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran que el suero MASP-2 -/- tiene un nivel más alto de actividad bactericida para el *N. meningitidis* que el suero WT y que la muerte de *N. meningitidis* dependiente del complemento en suero al 20 % depende de MASP-3 y MBL.

Ejemplo 4

20 Este ejemplo describe una serie de experimentos que se llevaron a cabo para determinar el mecanismo de la resistencia dependiente de la MASP-3 a la infección por *N. meningitidis* observada en ratones MASP-2 KO, como se describe en los ejemplos 1-3.

Fundamentos:

25 Con el fin de determinar el mecanismo de la resistencia dependiente de la MASP-3 a la infección por *N. meningitidis* observada en ratones MASP-2 KO (según se ha descrito en los ejemplos 1-3 anteriores), se llevaron a cabo una serie de experimentos de la siguiente manera.

1. Los ratones con deficiencia de la MASP-1/3 no tienen deficiencia de actividad funcional de la vía de la lectina (también conocida como “LEA-2”)

Métodos:

30 Para determinar si los ratones con deficiencia de MASP-1/3 son con deficiencia en la actividad funcional de la vía de la lectina (también denominada LEA-2), se llevó a cabo un ensayo para medir la cinética de la actividad de la C3 convertasa en el plasma obtenido de diversas especies de ratón con deficiencias del complemento, sometido a prueba en condiciones de ensayo específicas de la vía de activación de lectina (1 % de plasma), como se describe en Schwaeble W. y col., *PNAS* vol 108 (18): 7523-7528 (2011).

35 El plasma de ratones WT, C4 -/-, MASP-1/3 -/-; Factor B -/-, y MASP-2 -/- se sometió a prueba de la siguiente manera.

Para medir la activación de C3, se recubrieron unas placas de microtitulación con manano (1 µg/pocillo), zimosano (1 µg/pocillo) en tampón de revestimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM), o complejos inmunes, generados *in situ* mediante recubrimiento con 1 % de albúmina de suero humano (HSA) en tampón de recubrimiento y luego se añadió suero anti-HAS de oveja (2 µg/ml) en TBS (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) con Tween 20 al 0,05 % y Ca<sup>++</sup> 5 mM. Las placas se bloquearon con HSA al 0,1 % en TBS y se lavaron tres veces con TBS/Tween20/Ca<sup>++</sup>. Las muestras de plasma se diluyeron en barbital 4 mM, NaCl 145 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4, se añadieron a las placas y se incubaron durante 1,5 ha 37 °C. Después del lavado, se detectó C3b unido usando C3c de conejo anti-humano (Dako), seguido de IgG de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina y fosfato de p-nitrofenilo.

Resultados:

La cinética de activación de C3 (medida por depósito de C3b en las placas recubiertas con manano con suero al 1 %) en condiciones específicas de la vía de la lectina se muestra en la figura 16. No se observó escisión de C3 en el plasma de la MASP-2 <sup>-/-</sup>. El plasma del factor B <sup>-/-</sup> (Factor B <sup>-/-</sup>) escindió a C3 a la mitad de la velocidad del plasma WT, probablemente debido a la pérdida del ciclo de amplificación. Se observó un retraso significativo en la conversión dependiente de la vía de la lectina de C3 a C3b en C4<sup>-/-</sup> (T<sub>1/2</sub> = 33 min) así como en el plasma con deficiencia en MASP-1/3 <sup>-/-</sup> (T<sub>1/2</sub> = 49 min). Se ha demostrado que este retraso de la activación de C3 en el plasma de MASP-1/3 <sup>-/-</sup> depende más de MASP-1 que de MASP-3. (Véase Takahashi M. y col., *J. Immunol* 180: 6132 - 6138 (2008)). Estos resultados demuestran que los ratones con deficiencia de la MASP-1/3 no son con deficiencia en la actividad funcional de la vía de la lectina (también denominada "LEA-2").

2. Efecto de la deficiencia hereditaria de la MASP-3 en la activación de la vía alternativa.

Fundamentos:

El efecto de la deficiencia hereditaria de la MASP-3 en la activación de la vía alternativa se determinó analizando el suero de un paciente con síndrome de 3MC, con deficiencia de la MASP-3, causado por una mutación de cambio de marco en el exón que codifica la serina proteasa de la MASP-3. El síndrome de 3MC es una frase unificadora para los síndromes de Carneavale, Mingarelli, Malpuech y Michels superpuestos. Estos raros trastornos autosómicos recesivos exhiben un espectro de características de desarrollo, que incluyen dismorfismo facial característico, labio leporino y/o paladar hendido, craneosinostosis, discapacidad intelectual y anomalías genitales, de las extremidades y vesicorenales. Rooryck y colaboradores, *Nature Genetics* 43: 197-203 (2011) estudiaron 11 familias con síndrome 3MC e identificaron dos genes mutados, COLEC11 y MASP-1. Las mutaciones en el gen MASP-1 hacen que el exón que codifica el dominio de serina proteasa de la MASP-3, pero no los exones que codifican la serina proteasa de la MASP-1, sea disfuncional. Por lo tanto, los pacientes con 3MC con mutaciones en el exón que codifica la serina proteasa de la MASP-3 son con deficiencia en MASP-3 pero suficientes en MASP-1.

Métodos:

El suero con deficiencia de la MASP-3 se obtuvo de un paciente con 3MC, de la madre y del padre del paciente con 3MC (ambos heterocigotos para el alelo portador de una mutación que hace que el exón que codifica el dominio serina proteasa MASP-3 sea disfuncional), así como de un paciente con deficiencia de C4 (con deficiencia en ambos genes C4 humanos) y de un sujeto con deficiencia en MBL. Se llevó a cabo un ensayo de la vía alternativa, en condiciones específicas de la AP tradicional (BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA, sin Ca<sup>++</sup>, en donde BBS = solución salina tamponada con barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann y colaboradores, *Eur. J. Immunol* 11: 291-295 (1981)), sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano, a concentraciones en suero que varían de 0,5 a 25 % y se midió el depósito de C3b a lo largo del tiempo.

Resultados:

La figura 17 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b inducido por la vía alternativa en placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de sujetos con deficiencia de MASP-3, con deficiencia en C4 y con deficiencia en MBL. Tal como se muestra en la figura 17, el suero del paciente con deficiencia de la MASP-3 tiene actividad alternativa residual (AP) a altas concentraciones séricas (25 %, 12,5 %, concentraciones séricas de 6,25 %), pero un AP<sub>50</sub> significativamente mayor (es decir, 9,8 % de suero necesario para alcanzar el 50 % del depósito máximo de C3).

La figura 18 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b inducido por vía alternativa sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano en condiciones específicas de vía alternativa (específica de la AP) "tradicional" (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) en función del tiempo, en el 10 % de las muestras de suero humano obtenidas de sujetos humanos con deficiencia de C4, con deficiencia en MASP-3 y con deficiencia en MBL.

La tabla 11 presentada a continuación resume los resultados AP<sub>50</sub> enunciados en la figura 17 y las semividas para el depósito de C3b que se muestra en la figura 18.

Tabla 11: resumen de los resultados que se muestran en las figuras 17 y 18

Tipo de suero	AP <sub>50</sub> (%)	T <sub>1/2</sub> (min)
Deficiencia de MASP-3 (paciente con 3MC)	9,8	37,4
Madre del paciente con 3MC (heterocigota)	4,3	17,2
Padre del paciente con 3MC (heterocigota)	4,3	20,9
Con deficiencia de C4	4,0	11,6
Con deficiencia en MBL	4,8	11,0

Nota: en el tampón BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA, los efectos mediados por la vía de la lectina son deficientes debido a la ausencia de Ca<sup>++</sup> en este tampón.

5 Lejos de aceptar las limitaciones impuestas por ninguna teoría en particular, se cree que la menor actividad de la vía alternativa observada en el suero con deficiencia de la MASP-3 es consecuencia de que el paciente con 3MC tiene el factor D activo en su suero, y dado que este paciente todavía expresa MASP-1 y HTRA1, la conversión de pro-factor D todavía puede ocurrir en ausencia de la MASP-3, aunque en un nivel inferior.

3. Medición del depósito de C3b en manano, zimosano y *S. pneumonia D39*, en los sueros de ratones con deficiencia de la MASP-2 o MASP-1/3.

10 Métodos:

15 El depósito de C3b se midió en placas de microtitulación revestidas con manano, zimosano y *S. pneumonia D39*, usando concentraciones séricas de ratón que variaban de 0 % a 20 %, obtenidos de ratones MASP-2 -/-, MASP-1/3 -/- y WT. Los ensayos de depósito de C3b se llevaron a cabo en condiciones específicas de la vía alternativa "tradicional" (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o bien, en condiciones fisiológicas que permiten que la vía de la lectina y la vía alternativa funcionen (es decir, BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>).

Resultados:

20 La figura 19A ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b sobre placas de microtitulación recubiertas con manano como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de ratones WT con deficiencia en MASP-2 y MASP-1/3, en condiciones específicas de la vía alternativa (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>), o en condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>). La figura 19B ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano como una función de la concentración sérica en muestras de suero de ratones WT, con deficiencia en MASP-2 y MASP-1/3, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>), o en condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>). La figura 19C ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b en placas de microtitulación revestidas con *S. pneumoniae D39*, como una función de la concentración sérica en muestras de suero de ratones WT, con deficiencia en MASP-2 y MASP-1/3, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>), o en condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>).

30 La figura 20A ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b en sueros altamente diluidos, llevado a cabo en placas de microtitulación recubiertas con manano, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas que permiten tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas que varían desde 0 % hasta 1,25 %. La figura 20B ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en placas de microtitulación recubiertas con zimosano, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas que permiten que la vía de la lectina y la alternativa funcionen (BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas que van desde 0 % hasta 1,25 %. La figura 20C ilustra esquemáticamente los resultados de un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en placas de microtitulación recubiertas con *S. pneumoniae D39*, en condiciones específicas de la AP tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas tales que permiten el funcionamiento tanto de la vía de la

lectina como de la vía alternativa (BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando concentraciones séricas que van desde 0 % hasta 1,25 %.

Como se muestra en las figuras 20A-C, los ensayos de depósito de C3b también se llevaron a cabo en condiciones específicas de la vía alternativa (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) o en condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la alternativa funcionen (BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>), usando diluciones más altas, variables entre el 0 % y el 1,25 % del suero en placas revestidas de manano (figura 20A); en placas recubiertas con zimosano (figura 20B) y en placas recubiertas con *S. pneumoniae* D39 (figura 20C). La vía alternativa se desvanece bajo diluciones séricas más altas, por lo que la actividad observada en el suero con deficiencia de la MASP-1/3 en presencia de Ca<sup>++</sup> es actividad de la LP mediada por la MASP-2 y la actividad en suero con MASP-2 con deficiencia en el la presencia de Ca<sup>++</sup> es la activación residual mediada por la MASP-1/3 de la AP.

Discusión:

Los resultados descritos en este ejemplo demuestran que un inhibidor de la MASP-2 (o MASP-2 KO) proporciona una protección significativa contra la infección por *N. meningitidis*, promoviendo la activación de la vía alternativa impulsada por la MASP-3. Los resultados de los ensayos de bacteriolisis en suero de ratón y los ensayos de bacteriolisis en suero humano prueban, además, mediante el control de la actividad bactericida en suero contra *N. meningitidis*, que la actividad bactericida contra el *N. meningitidis* está ausente cuando hay deficiencia en MBL (sueros de ratón con doble deficiencia MBL A y MBL C y sueros humanos con deficiencia en MBL).

La figura 1 ilustra el nuevo concepto de la vía de la lectina y la vía alternativa sobre la base de los resultados proporcionados en este documento. La figura 1 delinea el papel de LEA-2 tanto en la opsonización como en la lisis. Si bien MASP-2 es el iniciador del depósito de C3b "aguas abajo" (y la opsonización resultante) en múltiples entornos dependientes de lectina fisiológicamente (figura 20A, 20B, 20C), también desempeña un papel en la lisis de las bacterias sensibles al suero. Como se ilustra en la figura 1, el mecanismo molecular propuesto responsable del aumento de la actividad bactericida del suero/plasma con deficiencia de la MASP-2 o reducción de la MASP-2 para patógenos sensibles al suero, tales como *N. meningitidis* es que, para la lisis de bacterias, los complejos de reconocimiento de la vía de la lectina asociados con MASP-1 y MASP-3 tienen que unirse muy cerca el uno del otro en la superficie bacteriana, permitiendo así que la MASP-1 escinda a la MASP-3. En contraste con la MASP-1 y la MASP-2, la MASP-3 no es una enzima autoactivante, pero, en muchos casos, requiere activación/escisión por la MASP-1 para convertirse en su forma enzimáticamente activa.

Como se muestra adicionalmente en la figura 1, la MASP-3 activada puede escindir entonces el factor B unido a C3b en la superficie del patógeno, para iniciar la cascada de activación de la vía alternativa mediante la formación de la C3 y C5 convertasa C3bBb y C3bBb(C3b)<sub>n</sub> de la vía alternativa enzimáticamente activa, respectivamente. Los complejos de activación de la vía lectina que portan MASP-2 no tienen parte en la activación de la MASP-3 y, en ausencia o después del agotamiento de la MASP-2, todos los complejos de activación de la vía de la lectina se cargarán con MASP-1 o MASP-3. Por lo tanto, en ausencia de la MASP-2, aumenta marcadamente la probabilidad de que en la superficie microbiana, los complejos de activación de la vía de la lectina portadores de MASP-1 y MASP-3 se asienten uno muy cerca del otro, lo que lleva a que se active más MASP-3 y, por lo tanto, a una mayor tasa de escisión mediada por la MASP-3 del factor B unido a C3b, para formar las C3 y C5 convertasas C3bBb y C3bBb(C3b)<sub>n</sub> de la vía alternativa en la superficie microbiana. Esto conduce a la activación de las cascadas de activación terminales C5b-C9 que forman el complejo de ataque a la membrana, compuesto por C5b unido a la superficie asociado con C6, C5bC6 asociado con C7, C5bC6C7 asociado con C8 y C5bC6C7C8, que conduce a la polimerización de C9, que se inserta en la estructura de la superficie bacteriana y forma un poro en la pared bacteriana, lo cual derivará en la destrucción osmótica de la bacteria dirigida por el complemento.

La esencia de este concepto novedoso reside en que los datos proporcionados en este documento muestran claramente que los complejos de activación de la vía de la lectina conducen las siguientes dos vías de activación distintas, como se ilustra en la figura 1:

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra el efecto inhibitorio de la deficiencia de la MASP-2 y/o la deficiencia de la MASP-3 en la lisis de los glóbulos rojos, de muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón con hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Antecedentes/justificación:

La hemoglobinuria nocturna paroxística (HPN), también conocida como síndrome de Marchiafava-Michelia, es una enfermedad de la sangre adquirida, potencialmente mortal, caracterizada por anemia hemolítica intravascular inducida por el complemento. El sello distintivo de la HPN es la hemólisis intravascular crónica mediada por el complemento, lo cual es una consecuencia de la activación no regulada de la vía alternativa del complemento debido a la ausencia de los reguladores del complemento, CD55 y CD59 en los eritrocitos de la HPN, con las consecuentes hemoglobinuria y anemia. Lindorfer, M.A., y col., *Blood* 115 (11) (2010), Risitano, A.M., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11: 528-535 (2011). La anemia en la HPN se debe a la destrucción de los glóbulos rojos en

el torrente sanguíneo. Los síntomas de la HPN incluyen orina de color rojo, debido a la aparición de hemoglobina en la orina, dolor de espalda, fatiga, dificultad para respirar y trombosis. La HPN puede desarrollarse por sí misma, conocida como "HPN primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, como la anemia aplásica, conocida como "HPN secundaria". El tratamiento para la HPN incluye transfusión de sangre para la anemia, anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege las células sanguíneas contra la destrucción inmune al inhibir el sistema del complemento (Hillmen P. y colaboradores, *N Engl. J Med* 350 (6): 552-9 (2004)). El eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige a los componentes del complemento C5, bloqueando su escisión por las C5 convertasas, impidiendo así la producción de C5a y el ensamblaje de la MAC. El tratamiento de pacientes con HPN con eculizumab ha producido una reducción de la hemólisis intravascular, medida por lactato deshidrogenasa (LDH), que conduce a la estabilización de la hemoglobina y la independencia de la transfusión en aproximadamente la mitad de los pacientes (Hillmen P, y colaboradores, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol 11 (6) (2011)). Si bien casi todos los pacientes sometidos a terapia con eculizumab alcanzan niveles normales o casi normales de LDH (debido al control de la hemólisis intravascular), solo alrededor de un tercio de los pacientes logran un valor de hemoglobina de aproximadamente 11 g/dl y los pacientes restantes con eculizumab continúan exhibiendo una anemia moderada a grave (es decir, dependiente de transfusiones), en proporciones aproximadamente iguales (Risitano AM y colaboradores, *Blood* 113: 4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano y colaboradores, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 11: 528-535 (2011), se demostró que los pacientes con HPN que recibían eculizumab contenían fragmentos de C3 unidos a una porción sustancial de sus eritrocitos de HPN (mientras que los pacientes no tratados, no), lo que lleva a la conclusión de que los fragmentos de C3 unidos a la membrana funcionan como opsoninas en los eritrocitos HPN, lo cual deriva en que queden atrapados en las células reticuloendoteliales a través de receptores C3 específicos y la posterior hemólisis extravascular. Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas —además del uso de eculizumab— para aquellos pacientes que desarrollan hemólisis extravascular mediada por fragmentos C3 porque continúan requiriendo transfusiones de glóbulos rojos.

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto del suero con deficiencia en MASP-2 y MASP-3 en la lisis de glóbulos rojos, tomados de muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón de HPN y demuestra la eficacia de la inhibición de la MASP-2 y/o de la inhibición de MASP-3 para tratar sujetos que padecen HPN, y también respalda el uso de inhibidores de inhibidores de la MASP-2 y/o MASP-3 (incluso inhibidores bilaterales o biespecíficos de la MASP-2/MASP-3) para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3 en sujetos de con HPN sometidos a una terapia con un inhibidor de C5, tal como el eculizumab.

Métodos:

Modelo animal de HPN:

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones con direccionamiento genético y deficiencias de Crry y C3 (Crry/C3 -/-) y ratones con deficiencia en CD55/CD59. A estos ratones les faltan los respectivos reguladores de complemento de superficie en sus eritrocitos, y estos eritrocitos, por lo tanto, son susceptibles a la autólisis de complemento espontáneo como lo son las células sanguíneas humanas de la HPN.

Con el fin de sensibilizar aún más estos eritrocitos, estas células se usaron con y sin recubrimiento con manano y luego se analizaron para detectar hemólisis en plasma de WT C56/BL6, en plasma con MBL nulo, en plasma de MASP-2 -/-, en plasma de MASP-1/3 -/-, en plasma NHS humano, MBL -/- humano y NHS tratado con anticuerpo humano de MASP-2.

I. Ensayo de hemólisis de eritrocitos murinos con doble deficiencia, Crry/C3 y CD55/CD59, en sueros deficientes/empequeñados en MASP-2 y controles

Día I. Preparación de RBC murinos (recubrimiento ± manano).

Materiales incluidos: sangre fresca de ratón, BBS/Mg<sup>++</sup> 1 Ca<sup>++</sup> (ácido barbitúrico 4,4 mM, Barbitona de sodio 1,8 mM, NaCl 145 mM, pH 7.4, Mg<sup>++</sup> 5 mM, Ca<sup>++</sup> 5 mM, cloruro de cromo, CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,5 mg/ml en BBS/Mg<sup>++</sup>; Ca<sup>++</sup>) y manano, 100 µg/ml en BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>.

La sangre entera (2 ml) se centrifugó durante 1-2 minutos a 2000 xg, en una centrífuga refrigerada a 4 °C. El plasma y la capa leucocitaria fueron aspirados. La muestra se lavó 3 veces volviendo a suspender el pellet de RBC en 2 ml de BBS helado/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> y repitiendo la etapa de centrifugación. Después del tercer lavado, el pellet se volvió a suspender en 4 ml de BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>. Se apartó una alícuota de 2 ml de RBC como control sin recubrimiento. A los 2 ml restantes, se añadieron 2 ml de CrCl<sub>3</sub> y 2 ml de manano y la muestra se incubó con mezcla suave a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción se terminó añadiendo 7,5 ml de BBS/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>. La muestra se centrifugó como se indicó anteriormente, se resuspendió en 2 ml de BBS/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> y se lavó otras dos veces como antes; luego se almacenó a 4 °C.

Día 2. Prueba de hemólisis

Los materiales incluyeron BBS/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> (como antes), sueros de prueba, placas de 96 pocillos de fondo

redondo y de fondo plano y un espectrofotómetro capaz de leer placas de 96 pocillos a 410-414 nm.

La concentración de RBC se determinó primero, y las células se ajustaron a  $10^9$ /ml, y se almacenaron a esta concentración. Antes del uso, las células se diluyeron en tampón de ensayo a  $10^8$ /ml, y luego se usaron 100  $\mu$ l por pocillo. La hemólisis se midió a 410-414 nm (permitiendo una sensibilidad mayor que 541 nm). Las diluciones de los sueros de prueba se prepararon en BBS/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> enfriados con hielo. 100  $\mu$ l de cada dilución de suero se pipetearon en una placa de fondo redondo. Se añadieron 100  $\mu$ l de preparación de RBC diluida apropiadamente (es decir,  $10^8$ /ml), se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 1 hora y se observaron para la lisis. (Las placas pueden fotografiarse en este punto). La placa se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos. Se aspiraron 100  $\mu$ l de la fase fluida, se transfirieron a placas de fondo plano, y se registró la OD a 410-414 nm. Los pelets de RBC se conservaron (estos se pueden lisar después con agua para obtener un resultado inverso).

#### Experimento 1

Se obtuvo sangre fresca de ratones con doble deficiencia de CD55/CD59 y sangre de ratones con doble deficiencia de Crry/C3 como se describe en detalle en el protocolo anterior. Las células se dividieron y la mitad de ellas se recubrió con manano y la otra mitad se dejó sin tratar, ajustando la concentración final a  $10^8$ /ml, de las cuales se usaron 100  $\mu$ l en el ensayo de hemólisis, que se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Resultados del experimento n.º 1: la vía de la lectina está implicada en la lisis de eritrocitos en el modelo animal de HPN

En un experimento inicial, se determinó que los eritrocitos de ratón WT no recubiertos no se lisaron en ningún suero de ratón. Se determinó, además, que los eritrocitos Crry<sup>-/-</sup> recubiertos con manano de ratón se lisaron lentamente (más de 3 horas a 37 grados), en el suero de ratón WT, pero no se lisaron en el suero sin MBL. (Datos no mostrados).

Se determinó que los eritrocitos Crry<sup>-/-</sup> de ratón recubiertos con manano se lisaron rápidamente en el suero humano, pero no así en el NHS inactivado por calor. Es importante destacar que los eritrocitos de ratón Crry<sup>-/-</sup> recubiertos con manano se lisaron en NHS diluido hasta 1/640 (es decir, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y diluciones 1/640 todas lisadas). (Datos no mostrados). En esta dilución, la vía alternativa no funciona (la actividad de la AP funcional se reduce significativamente por debajo del 8 % de concentración sérica).

#### Conclusiones del experimento n.º 1

Los eritrocitos Crry<sup>-/-</sup> de ratón recubiertos con manano se lisan muy bien en suero humano altamente diluido con MBL pero no sin MBL. La lisis eficiente en cada concentración sérica probada implica que la vía alternativa no está involucrada en esta lisis o no es necesaria para ella. La incapacidad de suero de ratón con deficiencia en MBL y del suero humano para lisar los eritrocitos Crry<sup>-/-</sup> de ratón recubiertos con manano indica que la vía clásica tampoco tiene nada que ver con la lisis observada. Como se requieren moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina (es decir, MBL), esta lisis está mediada por la vía de la lectina.

#### Experimento n.º 2

Se obtuvo sangre fresca de los ratones con doble deficiencia, de Crry/C3 y CD55/CD59 y se analizaron los eritrocitos de ratón Crry<sup>-/-</sup> recubiertos con manano en el ensayo de hemólisis como se describió anteriormente, en presencia del siguiente suero humano: MASP-3<sup>-/-</sup>; con MBL nula; WT; NHS pretratado con anticuerpo humano MASP-2; NHS inactivado por calor como control.

Resultados del experimento n.º 2: los inhibidores de la MASP-2 y la deficiencia de la MASP-3 previenen la lisis de eritrocitos en el modelo animal de la HPN

Con los eritrocitos de ratón Crry<sup>-/-</sup> recubiertos con manano, el NHS se incubó en las diluciones rebajadas hasta 1/640 (es decir, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640), de suero MBL<sup>-/-</sup> humano, suero humano con deficiencia de MASP-3 (del paciente con 3MC), y NHS pretratado con el mAb de MASP-2 y NHS inactivado por calor como control.

La placa de microtitulación ELISA se centrifugó, y los eritrocitos no lisados se recogieron en el fondo de la placa de pocillos redondos. El sobrenadante de cada pocillo, se recogió y la cantidad de hemoglobina liberada de los eritrocitos lisados se midió leyendo la OD415 nm en un lector de ELISA.

Se observó que el suero MASP-3<sup>-/-</sup> no lisó en absoluto los eritrocitos de ratón recubiertos con manano. En el control de NHS inactivado por calor (control negativo), como se esperaba, no se observó lisis. El suero humano lisó los eritrocitos de ratón recubiertos con manano en las diluciones de 1/8 y 1/16. El NHS pretratado con anticuerpo de la MASP-2 lisó los eritrocitos de ratón recubiertos con manano a una dilución 1/8 y 1/16, mientras que el suero humano WT lisó los eritrocitos de ratón recubiertos con manano hasta diluciones de 1/32.

La figura 21 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3<sup>-/-</sup>) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por

suero humano, en un intervalo de diluciones séricas en suero de la MASP- 3 *-/-*, NHS inactivado por calor (HI), MBL *-/-*, NHS pretratado con anticuerpo de la MASP - 2 y control de NHS.

La figura 22 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3 *-/-*) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por suero humano, en un intervalo de concentración sérica en suero de la MASP-3 *-/-*, NHS inactivado por calor (HI), MBL *-/-*, NHS pretratado con anticuerpo de la MASP-2 y control de NHS.

A partir de los resultados presentados en las figuras 21 y 22, se demuestra que la inhibición de la MASP-3 evitará cualquier lisis mediada por el complemento de eritrocitos sensibilizados con protección deficiente de la activación del complemento autólogo. La inhibición de la MASP-2 con el anticuerpo de la MASP-2 modificó significativamente el valor de CH<sub>50</sub> y fue protectora en cierta medida, pero la inhibición de la MASP-3 fue más efectiva.

Experimento n. ° 3

Los eritrocitos de ratón Crry *-/-* no recubiertos obtenidos de sangre fresca de los ratones con doble deficiencia Crry/C3 y CD55/CD59 se analizaron en el ensayo de hemólisis, como se describió anteriormente, en presencia de los siguientes sueros: MASP-3 *-/-*; MBL *-/-*; WT; NHS pretratado con anticuerpo humano MASP-2 y NHS inactivado por calor como control.

Resultados:

La figura 23 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón WT lisados en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos, en un intervalo de concentraciones séricas en sueros humanos de un paciente con 3MC (MASP-3 *-/-*). NHS inactivado por calor (HI), MBL *-/-*, NHS pretratado con anticuerpo de la MASP-2 y control de NHS. Tal como se observa en la figura 23 y se resume en la tabla 12, se demuestra que la inhibición de la MASP-3 inhibe la lisis mediada por el complemento de eritrocitos de ratón WT no sensibilizados.

La figura 24 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (CD55/59 *-/-*) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos por suero humano, en un intervalo de concentraciones séricas en sueros humanos por calor - NHS activado (HI), MBL *-/-*, NHS pretratado con anticuerpo de la MASP-2 y control de NHS. Tal como se observa en la figura 24 y se resume en la tabla 12, se demuestra que la inhibición de la MASP-2 fue protectora hasta un punto limitado.

Tabla 12: valores CH<sub>50</sub> expresados como concentraciones séricas

Suero	WT	CD55/59 <i>-/-</i>
Paciente con 3MC	Sin lisis	Sin lisis
NHS inactivado por calor	Sin lisis	Sin lisis
Donante de MBL AO/XX (con deficiencia en MBL)	7,2 %	2,1 %
NHS + anticuerpo de MASP-2	5,4 %	1,5 %
NHS	3,1 %	0,73 %

Nota: "CH<sub>50</sub>" es el punto en el cual la hemólisis mediada por el complemento alcanza el 50 %.

En resumen, los resultados observados en este ejemplo demuestran que la inhibición de la MASP-3 evita cualquier lisis del complemento de los eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados con una protección deficiente de la activación del complemento autólogo. La inhibición de la MASP-2 también es protectora en cierta medida. Por lo tanto, los inhibidores de MASP-2 y MASP-3, ya sea solos o en combinación (es decir, coadministrados, administrados secuencialmente) o los inhibidores biespecíficos o duales MASP-2/MASP-3 pueden usarse para tratar a los sujetos que padecen HPN, y también pueden utilizarse para mejorar (es decir, inhibir, prevenir o reducir la gravedad de) la hemólisis extravascular en pacientes con HPN sometidos a tratamiento con un inhibidor de C5 como eculizumab (Soliris®).

Ejemplo 6

Este ejemplo describe un ensayo de hemólisis que prueba eritrocitos de conejo recubiertos con manano para la lisis, en presencia de sueros de ratón WT o MASP-1/3 *-/-*.

Métodos:

1. Ensayo de hemólisis de RBC de conejo (recubiertos con manano) en sueros con deficiencia en MASP-113 de ratón y sueros de control de WT

Día 1. Preparación de RBC de conejo.

5 Materiales incluidos: sangre fresca de conejo, BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> (ácido barbitúrico 4,4 mM, barbitona sódica 1,8 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4, Mg<sup>++</sup> 5 mM, Ca<sup>++</sup> 5 mM), BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> con gelatina al 0,1 %, cloruro de cromo contenido en tampón; es decir, CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,5 mg/ml en BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>) y manano, 100 µg/ml en BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>.

10 1. La sangre entera de conejo (2 ml) se dividió en dos tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 8000 rpm (aproximadamente 5,9 rcf), en una centrífuga eppendorf refrigerada a 4 °C. El pelet de RBC se lavó tres veces después de volver a suspender en BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> enfriado en hielo. Después del tercer lavado, el pelet se volvió a suspender en 4 ml de BBS/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup>. Se añadieron dos ml de esta alícuota a un tubo Falcon de 15 ml para usar como control sin recubrimiento. Los 2 ml restantes de la alícuota de los glóbulos rojos se diluyeron en 2 ml de tampón CrCl<sub>3</sub>, se añadieron 2 ml de la solución de manano y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos con una mezcla suave. La reacción se terminó añadiendo 7,5 ml de BBS/gelatina al 0,1 %/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> a la mezcla. Los eritrocitos se peletizaron, y los RBC se lavaron dos veces con BBS/gelatina al 0,1 %/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> como se describió anteriormente. La suspensión de glóbulos rojos se almacenó en BBS/gelatina al 0,1 %/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> a 4 °C.

20 2. 100 µl de los RBC suspendidos se diluyeron con 1,4 ml de agua y se centrifugaron a 8000 rpm (aproximadamente 5,9 rcf) durante 3 minutos y la OD del sobrenadante se ajustó a 0,7 a 541 nm (una OD de 0,7 a 541 nm corresponde aproximadamente a 10<sup>9</sup> eritrocitos/ml).

3. Los RBC re-suspendidos se diluyeron con BBS/gelatina al 0,1 %/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> a una concentración de 10<sup>8</sup>/ml.

25 4. Las diluciones de los sueros de prueba se prepararon en BBS/gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> enfriado con hielo y se pipetearon 100 µl de cada dilución de suero en el pocillo correspondiente de la placa de fondo redondo. Se añadieron 100 µl de los RBC diluidos de un modo adecuado (108 ml) a cada pocillo. Como control para la lisis completa, se mezcló agua purificada (100 µl) con los RBC diluidos (100 µl) para lograr el 100 % de lisis, mientras que BBS/0,1 % de gelatina/Mg<sup>++</sup>/Ca<sup>++</sup> sin suero (100 µl) se usó como control negativo. La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C.

30 5. La placa de fondo redondo se centrifugó a 3250 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de cada pocillo (100 µl) se transfirió a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano y se leyó la OD en un lector de ELISA a 415-490 nm. Los resultados se informan como la relación entre la OD a 415 nm y la relación a 490nm.

Resultados:

35 La figura 25 ilustra esquemáticamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medida por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano, mediante suero de ratón, en un intervalo de concentraciones séricas en suero de la MASP-1/3 -/- y WT de control. Tal como se muestra en la figura 25, se demuestra que la inhibición de la MASP-3 evita la lisis mediada por el complemento de los eritrocitos de conejo WT recubiertos con manano. Estos resultados apoyan adicionalmente el uso de inhibidores de la MASP-3 para el tratamiento de uno o más aspectos de la HPN como se describe en el ejemplo 5.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que la vía alternativa se activa en el suero con deficiencia en factor D en presencia de Ca<sup>++</sup>.

40 Experimento n. ° 1: ensayo del depósito de C3b en condiciones específicas de la vía alternativa

Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo del depósito de C3b sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano, en condiciones específicas de la vía alternativa (BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup>, sin Ca<sup>++</sup>), usando diluciones en aumento de los siguientes sueros de ratón: factor D -/-; MASP- -/- y WT.

45 Resultados:

50 La figura 26 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) como una función de la concentración sérica en muestras de suero del factor D -/-, MASP-2 -/- y en sueros de ratones WT en un ensayo de depósito de C3 llevado a cabo en condiciones específicas de la vía alternativa. Tal como se muestra en la figura 26, en estas condiciones, el suero de ratón del factor D -/- no activa C3 en absoluto y la vía alternativa no está funcionando. El suero MASP-2 -/- muestra una activación de la vía alternativa, a una velocidad similar a la del suero WT. Estos resultados confirman que, en ausencia de Ca<sup>++</sup>, se requiere factor D para el depósito de C3b. Esto es

consistente con la evidencia de que la MASP-3 no puede convertirse en su forma enzimáticamente activa en estas condiciones porque las interacciones de la MASP-1, la enzima activadora de MASP-3, y la MASP-3 con sus respectivos componentes de reconocimiento de carbohidratos dependen del  $\text{Ca}^{++}$ .

Experimento 2: ensayo de depósito de C3b en condiciones fisiológicas

5 Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo del depósito de C3b, en condiciones fisiológicas (BBS/ $\text{Ca}^{++}$ / $\text{Mg}^{++}$ ) (permitiendo que funcionen tanto la LP como la AP), usando diluciones en aumento de los siguientes sueros de ratón: factor D -/-; MASP-2 -/- y WT.

Resultados:

- 10 La figura 27 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) como una función de la concentración sérica, usando muestras de suero del factor D -/-; MASP-2 -/- y ratones WT en un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en condiciones fisiológicas (en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ ). Tal como se muestra en la figura 27, el suero de ratón del factor D -/- activa C3 tanto a través de la lectina como de la vía alternativa sin diferencia, en comparación con el suero WT a través de las diluciones séricas indicadas. El suero MASP- -/- muestra el
- 15 rendimiento de C3 en diluciones séricas inferiores por la vía alternativa solamente (es decir, activación de la vía alternativa dirigida por la MASP-3). Estos resultados indican que en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ , el factor D no es necesario, dado que la MASP-3 puede impulsar la actividad de la vía alternativa.

Experimento n. ° 3: ensayo de depósito de C3b usando sueros de ratón con deficiencia en el factor B o en el factor D, en presencia o ausencia del mAb de la MASP-2

20 Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo de depósito de C3b en condiciones fisiológicas (BBS/ $\text{Ca}^{++}$ / $\text{Mg}^{++}$ ), sobre placas de microtitulación recubiertas con manano de la siguiente manera:

1. Las placas ELISA de microtitulación se recubrieron durante la noche, a 4 °C con manano (1 µg/ml), en tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM, azida sódica al 0,02 %, pH 9,6).
- 25 2. Al día siguiente, los sitios de unión a proteínas residuales se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con 250 µl/pocillo con HSA al 0,1 % en BBS (barbital 4 mM, NaCl 145 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,4).
3. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (TBS con Tween 20 al 0,05 % y  $\text{CaCl}_2$  5 mM).
4. Se incorporaron las muestras de suero diluidas 1:10 en BBS a los pocillos en los momentos especificados. Los pocillos que recibieron solo tampón se usaron como controles negativos. La placa se incubó a 37 °C durante un
- 30 lapso de hasta 40 minutos.
5. Las placas se lavaron 3 veces con el tampón de lavado.
6. Luego se añadieron 100 µl de C3c antihumano de conejo (Dako) diluido 1: 5000 en tampón de lavado a los pocillos, y las placas se incubaron durante 90 minutos a 37 °C.
7. Después de lavar tres veces con tampón de lavado, se añadieron a los pocillos 100 µl de anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido con 1:5000 en tampón de lavado, a lo cual siguió la incubación durante 90 minutos, a
- 35 temperatura ambiente.
8. Después del lavado, se detectó fosfatasa alcalina al agregar 100 µl de la solución del sustrato.
9. Después de la incubación durante 15 minutos, se midió la densidad óptica, a OD 405 nm.

Resultados:

- 40 La figura 28 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b (OD 405 nm) como una función del tiempo de incubación del suero (minutos) en muestras de suero de ratón obtenidas de ratones con factor D-/- o factor B -/-, en presencia o ausencia de mAb de la MASP-2, en un ensayo de depósito de C3b llevado a cabo en condiciones fisiológicas (en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ ). Tal como se muestra en la figura 28, no hay diferencia en la cantidad de depósito de C3b en el suero WT y en el suero del factor D-/-, lo que proporciona un fuerte respaldo para la conclusión de que
- 45 la MASP-3 puede iniciar la activación de la vía alternativa, incluso en ausencia del factor D. Se cree que la señal observada se debe tanto a la activación de la vía de la lectina como de la vía alternativa. Como se muestra adicionalmente en la figura 28, el factor D -/- más el mAb de la MASP-2 muestra solo la activación de la vía alternativa mediada por la MASP-3. El factor B -/- más el mAb de la MASP-2 era solo un elemento de referencia (datos no mostrados). El suero inactivado por calor se utilizó como el valor de control de referencia, que era idéntico

al factor D -/- y al factor B -/- con MASP-2 (datos no mostrados).

En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran que el factor D solo es esencial en condiciones no fisiológicas (es decir, cuando se prueba la activación de la vía alternativa en BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> en ausencia de Ca<sup>++</sup>). Por el contrario, cuando se prueba la activación de la vía alternativa en condiciones fisiológicas (en presencia de Ca<sup>++</sup>), que permite que la vía alternativa se active a través de la MASP-3, el suero con deficiencia en factor D no es con deficiencia en la actividad alternativa de la vía, en comparación con el WT de control. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, el factor D es redundante, ya que el inicio de la activación de la vía alternativa se produce a instancias de la MASP-3. Estos resultados respaldan la conclusión de que la vía de la lectina dirige la activación de la AP a través de un evento de activación dependiente de la MASP-3.

## 10 Ejemplo 8

Este ejemplo describe métodos ejemplares para producir anticuerpos monoclonales murinos contra polipéptidos humanos de la MASP-1, MASP-2 o MASP-3, y para generar anticuerpos de la MASP duales, biespecíficos o pan-específicos.

### 1. Métodos para generar anticuerpos de la MASP

15 A unos ratones macho A/J (Harlan, Houston, TX), de 8 a 12 semanas de edad, se les inyectaron por vía subcutánea 100 µg de polipéptidos humanos de longitud completa: rMASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10), rMASP-2 (ID. DE SEC. N.º 5) o rMASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8), o fragmentos de antígeno de los mismos, por ejemplo como se expone en la tabla 2, en adyuvante de Freund completo (Difco Laboratories, Detroit, MI), en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4. Dos semanas después, a los ratones se les inyectaron 50 µg del mismo polipéptido humano por vía subcutánea, en adyuvante de Freund incompleto. En la sexta semana, a los ratones se les inyectaron 50 µg del mismo polipéptido humano en PBS y se fusionan 4 días después.

25 Para cada fusión, se preparan suspensiones de células individuales tomadas del bazo de un ratón inmunizado y se usan para la fusión con células de mieloma Sp2/0. 5 x 10<sup>6</sup> de las células del bazo Sp2/0 y 5 x 10<sup>8</sup> se fusionan en un medio que contiene 50 % de polietilenglicol (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) y 5 % de sulfóxido de dimetil (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las células se ajustan luego a una concentración de 1,5 x 10<sup>5</sup> células de bazo por 200 µl de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, NY), complementado con 10 % de suero bovino fetal, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomocina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM. Se añaden doscientos microlitros de la suspensión celular a cada pocillo contenido en aproximadamente veinte placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de alrededor de diez días, los sobrenadantes de cultivo se retiran para la selección por reactividad con el antígeno purificado objetivo (MASP-1, MASP-2 o MASP-3, o el fragmento de antígeno de la tabla 2) en un ensayo ELISA.

35 Ensayo ELISA (descrito con referencia a la MASP-2): los pocillos de unas placas para microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) se recubren añadiendo 50 µl de hMASP-2 purificado a 50 ng/ml durante la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de la MASP-2 utilizada para el recubrimiento permite la selección de anticuerpos de alta afinidad. Después de retirar la solución de recubrimiento moviendo la placa, se agregan 200 µl de BLOTTO (leche desnatada sin grasa) en PBS a cada pocillo durante una hora, para bloquear los sitios no específicos. Una hora más tarde, los pocillos se lavan con un tampón PBST (PBS que contiene 0,05 % de Tween 20). Los sobrenadantes de cultivo de cada pocillo de fusión (50 µl) se mezclan con 50 µl de BLOTTO y luego se añaden a pocillos individuales recubiertos con MASP-2 de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavan con PBST y la unión del anticuerpo a MASP-2 se detecta añadiendo IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) (específica de Fe) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa). La IgG anti-ratón conjugada con HRP se diluye apropiadamente en BLOTTO para proporcionar una relación señal-ruido apropiada, y se agrega a cada pocillo que contiene la muestra. Después del lavado, el anticuerpo conjugado con HRP unido se detecta con la solución de sustrato de peroxidasa. Una solución de sustrato de peroxidasa que contiene 0,1 % de 3,3,5,5 tetrametil bencidina (Sigma, St. Louis, Mo.) y 0,0003 % de peróxido de hidrógeno (Sigma) se agrega a los pocillos para el desarrollo del color durante 30 minutos. La reacción se termina mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M por pocillo y la densidad óptica a 450 nm de la mezcla de reacción se mide con un lector BioTek ELISA (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Ensayo de unión (descrito con referencia a la MASP-2):

50 Los sobrenadantes de cultivo que dan positivo en el ensayo ELISA de la MASP-2 descrito anteriormente pueden analizarse en un ensayo de unión, para determinar la afinidad de unión que tienen los agentes inhibidores de la MASP-2 por la MASP-2. También se puede usar un ensayo similar para determinar si los agentes inhibidores se unen a otros antígenos en el sistema del complemento.

55 Los pocillos de placa de microtitulación de poliestireno (placas de unión de medio de 96 pocillos, Corning Costar, Cambridge, MA) se recubren con MASP-2 (20 ng/100 µl/pocillo, Advanced Research Technology, San Diego, CA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Después de aspirar la solución de la MASP-2, los pocillos se bloquean con PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1 % (BSA; Sigma Chemical)

durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos sin recubrimiento de MASP-2 sirven como controles de referencia. Se añaden a los pocillos alícuotas de sobrenadantes de hibridoma o MoAbs purificados de la MASP-2, a concentraciones variables en solución de bloqueo de BSA PBS. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagan extensamente con PBS. El MoAb de la MASP-2 unido a MASP-2 se detecta mediante la adición de IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa (Sigma Chemical) en solución bloqueadora, que se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se enjuaga de nuevo y por completo con PBS y se añaden 100 µl de sustrato 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción de TMB se templata mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 1 M, y la placa se lee a 450 nm en un lector de microplacas (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

- 5
- 10 Después, los sobrenadantes de cultivo de los pocillos positivos se ponen a prueba para determinar la capacidad de inhibir la activación del complemento en un ensayo funcional, tal como el ensayo de escisión de C4 como se describe en la presente memoria descriptiva (ejemplo 9). Las células en los pocillos positivos se clonan luego mediante dilución limitante. Los MoAb se prueban nuevamente para determinar su reactividad con hMASP-2 en un ensayo ELISA, como se describió anteriormente. Los hibridomas seleccionados se cultivan en matraces giratorios, y el sobrenadante de cultivo agotado se recoge para la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad de proteína A.
- 15

Los anticuerpos de MASP-2 pueden someterse a prueba para determinar la actividad inhibidora de LEA-2 en un ensayo de escisión C4, como el que se describe en el ejemplo 9.

- 20 Aunque el ELISA y el ensayo de Unión anterior se describen con referencia a la MASP-2, los expertos en la técnica entenderán que los mismos ensayos ELISA y de unión pueden llevarse a cabo utilizando polipéptidos de MASP-1 o MASP-3 y fragmentos de antígenos de los mismos (por ejemplo, como se describe en la tabla 2). Los anticuerpos MASP-3 pueden someterse a ensayo para la inhibición de la escisión de la serina proteasa de la MASP-3 de un sustrato MASP-3 y para la actividad inhibidora de LEA-1 en un ensayo de depósito de C3b, por ejemplo como se describe en el ejemplo 4, en un ensayo de hemólisis como se describe en el ejemplo 5. Los anticuerpos de la MASP-1 pueden someterse a ensayo para la inhibición de la escisión de la serina proteasa de la MASP-1 de un sustrato MASP-1, para la inhibición de la activación de la MASP-3 y para la actividad inhibidora de LEA-1 en un ensayo de depósito de C3b, por ejemplo, como se ha descrito en el ejemplo 4, y en un ensayo de hemólisis, como se describe en el ejemplo 5.
- 25

## 2. Métodos para generar anticuerpos duales de la MASP

- 30 Anticuerpos inhibidores duales de MASP-2/3: como se muestra en las figuras 4, 6 y 7C, hay regiones conservadas entre MASP-2 y MASP-3 en el dominio de serina proteasa, codificadas por la cadena beta de la ID. DE SEC. N.º 5 e ID. DE SEC. N.º 8. Por lo tanto, se puede generar un anticuerpo doble MASP-2/3 usando un antígeno que comprenda el dominio de serina proteasa de la MASP-2 (o MASP-3) o que consista en él, tal como la cadena beta de la ID. DE SEC. N.º 5 (o ID. DE SEC. N.º 8) para generar un anticuerpo monoclonal como se describió con anterioridad, o de un modo alternativo, estos antígenos se pueden usar para seleccionar una biblioteca de fagos para clones que se unen específicamente a estos antígenos, seguido de detección de unión dual a MASP-3 (o MASP-1). Los anticuerpos duales MASP-2/3 se criban luego para determinar su actividad inhibidora en un ensayo funcional, por ejemplo como se describe en la tabla 2.
- 35

- 40 Anticuerpos inhibidores duales de MASP-1/3: como se muestra en las figuras 3-5, la MASP-1 y la MASP-3 comparten una región idéntica conservada en el dominio CUBI-CCP2 (aa 25-432 de la ID. DE SEC. N.º 10), que también es compartido por MAP44. Tal como se muestra en la figura 3, la MAP44 no contiene un dominio CCP2. Por lo tanto, se genera un anticuerpo dual de la MASP-1/3 que incluye MAP44 usando un antígeno que comprende el dominio CUBI-CCP-2 de la MASP-1 (o MASP-3) o que consiste en él, para generar un anticuerpo monoclonal como se describió antes, o alternativamente, este antígeno se usa para seleccionar una biblioteca de fagos para clones que específicamente se unen a este antígeno, seguido por el cribado de la unión dual a MASP-3 (o MASP-1). Se genera un anticuerpo dual de la MASP-1/3 exclusivo de MAP44 de una manera similar, usando un antígeno que comprende el dominio CCP2 de la MASP-1 (o MASP-3) o que consiste en él. Posteriormente, los anticuerpos duales de la MASP-1/3 se criban para determinar su actividad inhibidora en un ensayo funcional, por ejemplo como se describe en la tabla 2.
- 45

- 50 Anticuerpos inhibidores duales de la MASP-1/2: como se muestra en las figuras 4, 6 y 7A, el dominio de serina proteasa de la MASP-1 y de la MASP-2 contiene regiones que están conservadas. Por lo tanto, se genera un anticuerpo dual de la MASP-1/2 usando un antígeno que comprende el dominio serina proteasa de la MASP-1 (o MASP-2) o que consiste en él, para generar un anticuerpo monoclonal como se describió anteriormente, o de un modo alternativo, este antígeno se usa para seleccionar una biblioteca de fagos para clones que se unen específicamente a este antígeno, seguido de detección de unión dual a MASP-2 (o MASP-1). Después, los anticuerpos duales MASP-1/2 se seleccionan para determinar su actividad inhibidora en un ensayo funcional, por ejemplo como se describe en la tabla 2.
- 55

## 3. Métodos para generar anticuerpos pan-específicos de la MASP:

Cadena alfa: numerosos parches de identidad entre MASP-2 y MASP-1/3 sugieren que puede ser posible generar anticuerpos monoclonales que se unan a MASP-1/3 y MASP-2. En particular, la mayor parte de la identidad se encuentra dentro de los dominios CUB1-EGF-CUB2, tal como se muestra en la figura 5. Los diversos dominios ilustrados en la figura 5 se identificaron de acuerdo con Yongqing, y col., *Biochemica et Biophysica Acta* 1824: 253-262 (2012); Teillet y col., *J. Biol. Chem.* 283: 25715 - 25724 (2008); y Marchler-Bauer y colaboradores, *Nucleic Acids Res.* 39: D225-229 (2011).

Cadena beta: numerosos parches de identidad entre MASP-2 y MASP-1/3, tal como se muestra en la figura 6, permitirían la generación de un inhibidor pan-específico de la MASP-1/2/3.

Métodos:

10 Los anticuerpos pan-específicos inhibidores de la MASP (es decir, anticuerpos que inhiben la actividad de la MASP-1, 2 y 3) se generan de la siguiente manera:

1. Se selecciona una biblioteca contra los dominios CUB1-EGF-CUB2 de la cadena alfa de la MASP-1/3 y MASP-2 y se seleccionan clones que reaccionen de forma cruzada con la MASP-1/3 y MASP-2.

15 2. Se seleccionan los clones por la capacidad de inhibir la actividad funcional, por ejemplo como se describe en la tabla 2.

3. Se utiliza la tecnología de maduración de la afinidad/funcionalidad DTLacO (Yabuki y colaboradores, *PLoS ONE*, 7(4): e36032 (2012)) para optimizar tanto la unión a las tres proteínas como la función inhibidora.

4. Como se describe en la tabla 2, los inhibidores pan-MASP se pueden usar para inhibir la activación del complemento mediada por el LEA-1 y LEA-2.

20 4. Métodos para generar anticuerpos biespecíficos de la MASP-2/3

Los anticuerpos inhibidores biespecíficos de la MASP-2/3 se generan de la siguiente manera:

1. Se han identificado anticuerpos inhibidores específicos de la MASP-2 ejemplares que se unen al dominio CCP1 e inhiben la activación del complemento dependiente de la MASP-2, como se describe en los ejemplos 11-14.

25 2. Se genera un anticuerpo inhibidor específico de la MASP-3 seleccionando una biblioteca contra el polipéptido de la MASP-3 e identificando anticuerpos de MASP-3, como se describe en el ejemplo 15, seguido por el ensayo de anticuerpos para la actividad inhibidora de LEA-1 en un ensayo funcional; por ejemplo, como se describe en la tabla 2. Los anticuerpos ejemplares de la MASP-3 se describen en el ejemplo 15.

30 3. La región de unión al antígeno específica para MASP-2 y MASP-3 se clona en un marco, para generar un anticuerpo biespecífico. Se han descrito numerosos formatos de anticuerpos biespecíficos, que incluyen formatos similares a las inmunoglobulinas G, así como diversas configuraciones de proteínas de fusión y fragmentos de cadena única (Holmes, *Nature Reviews, Drug Discovery* 10: 798-800 (2011), Müller y Kontermann, *Biodrugs* 24: 89-98 (2010)). En un ejemplo, se pueden generar anticuerpos biespecíficos fusionando dos hibridomas que expresan anticuerpos contra dos antígenos distintos, lo que da como resultado varios apareamientos de cadenas pesadas y ligeras, un porcentaje del cual comprende una cadena pesada y ligera específicas para un antígeno emparejado con una cadena pesada y ligera específicas para el otro antígeno (Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537-539 (1983)). Se puede generar un anticuerpo biespecífico similar de forma recombinante, coexpresando dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades. Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) (por ejemplo, anticuerpos de la MASP-2, como se describe en los ejemplos 11-14, anticuerpos de la MASP-3 como se describe en el ejemplo 15) se pueden fusionar a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, preferiblemente, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye al menos parte de la bisagra, C<sub>H</sub>2, y regiones C<sub>H</sub>3. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado.

45 Además de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina emparejadas, el enlace de fragmentos variables monocatenarios específicos para dos dianas diferentes se ejemplifica en Kipriyanov y col., *J Mol. Biol.* 293: 41 (1999)). En este ejemplo, se diseña un único constructo de expresión de polinucleótido para codificar dos pares de regiones variables de cadena pesada y ligera, separadas por péptidos enlazadores, donde cada par imparte especificidad por un objetivo de proteína distinto. Tras la expresión, el polipéptido se ensambla en una configuración en la que el par de cadena pesada y ligera específico para un objetivo forma una superficie de unión al antígeno de la proteína, y el otro par forma una superficie de unión al antígeno separada, creando una molécula llamada diacuerpo de cadena única o monocatenario. Dependiendo de la longitud del enlazador entre el par central de regiones variables de la cadena pesada y ligera, el polipéptido también se puede forzar para que dimerice, lo cual da como resultado la formación de un diacuerpo en tándem.

Por ejemplo, el ADN que codifica los siguientes polipéptidos de inmunoglobulina puede insertarse en uno o más vectores y expresarse en un organismo hospedador adecuado para generar los siguientes ejemplos ilustrativos y no limitativos de anticuerpos biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos de MASP-2/3

5 En un caso, se proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a la MASP-2 humana y a la MASP-3 humana y que comprende lo siguiente:

(I) una región de unión específica de la MASP-2, que comprende al menos uno o más de los siguientes: a) una región variable de la cadena pesada que comprende: i) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 31-35 de la ID. DE SEC. N.º 21; y ii) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-65 de la ID. DE SEC. N.º 21; y iii) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 95-102 de la ID. DE SEC. N.º 21; y/o al menos uno o más de los siguientes: b) una región variable de la cadena ligera que comprende: i) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 24-34 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y ii) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-56 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y iii) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 89-97 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27 y

(II) una región de unión específica de la MASP-3, opcionalmente una región de unión específica de la MASP-3 que comprende al menos uno de los siguientes: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 31-35 de la ID. DE SEC. N.º 25 o la ID. DE SEC. N.º 26; y ii) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-65 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 26; y iii) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 95-102 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 26 y

b) una región variable de la cadena ligera que comprende: i) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 24-34 de la ID. DE SEC. N.º 28 o ID. DE SEC. N.º 29; y ii) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-56 de la ID. DE SEC. N.º 28 o ID. DE SEC. N.º 29; y iii) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 89-97 de la ID. DE SEC. N.º 28 o ID. DE SEC. N.º 29.

Anticuerpos biespecíficos de la MASP-1/2

30 En un caso, se proporciona un anticuerpo biespecífico que se une a la MASP-1 humana y a la MASP-2 humana y que comprende lo siguiente:

(I) una región de unión específica de la MASP-2 que comprende al menos uno o más de los siguientes: a) una región variable de la cadena pesada que comprende: i) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 31-35 de la ID. DE SEC. N.º: 21; y ii) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-65 de la ID. DE SEC. N.º 21; y iii) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de 95-102 de la ID. DE SEC. N.º 21; y/o al menos uno o más de los siguientes: b) una región variable de la cadena ligera que comprende: i) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 24-34 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º: 27; y ii) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 50-56 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y iii) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de 89-97 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y

(II) una región de unión específica de la MASP-1.

4. Se lleva a cabo la prueba de la actividad inhibidora funcional contra MASP-2 y/o MASP-3, por ejemplo, como se describe en la tabla 2, y como se describe adicionalmente en este documento.

Ejemplo 9

45 Este ejemplo describe un ensayo de escisión de C4 *in vitro* utilizado como un cribado funcional para identificar agentes inhibidores de la MASP-2 capaces de bloquear la activación del complemento dependiente de la MASP-2, a través de L-ficolina/P35, H-ficolina, M-ficolina o manano.

Ensayo de escisión C4: Petersen, S.V., y col., han descrito un ensayo de escisión de C4. *J. Immunol. Methods* 257: 107, 2001, que mide la activación de la vía de la lectina resultante del ácido lipoteicoico (LTA) en el *S. aureus*, que se une a L-ficolina.

50 Reactivos: se prepara el *S. aureus* fijado con formalina (DSM20233) de la siguiente manera: las bacterias se cultivan durante la noche a 37 °C en un medio de sangre de soja triptica, se lavan tres veces con PBS, luego se fijan durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS/formalina al 0,5 %, y se lavan otras tres veces con PBS, antes de

resuspenderse en tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM,  $\text{NaHCO}_3$  35 mM, pH 9,6).

5 Ensayo: Los pocillos de una placa de microtitulación Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) se recubren con: 100  $\mu\text{l}$  de *S. aureus* fijado en formalina DSM20233 ( $\text{OD}_{550} = 0,5$ ) en tampón de recubrimiento con 1  $\mu\text{g}$  de L-ficolina en tampón de recubrimiento. Después de la incubación durante la noche, los pocillos se bloquean con albúmina sérica humana al 0,1 % (HSA) en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4), luego se lavan con TBS que contiene Tween 20 al 0,05 % y  $\text{CaCl}_2$  5 mM (tampón de lavado). Las muestras de suero humano se diluyen en Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Triton X-100 al 0,05 %, HSA al 0,1 %, pH 7,4, que previene la activación de C4 endógeno y disocia el complejo C1 (compuesto de C1q, C1r y C1s). Los agentes inhibidores de la MASP-2, que incluyen los MoAbs de la MASP-2, se añaden a las muestras de suero en concentraciones variables. Las muestras diluidas se agregan a la placa y se incuban durante la noche a 4 °C. Después de 24 horas, las placas se lavan completamente con tampón de lavado, luego se añade 0,1  $\mu\text{g}$  de C4 humano purificado (obtenido como se describe en Dodds, A.W., *Methods Enzymol.* 223: 46, 1993) en 100  $\mu\text{l}$  de barbital 4 mM, NaCl 145 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,4 a cada pocillo. Después de 1,5 horas a 37 °C, las placas se vuelven a lavar y el depósito de C4b se detecta usando C4c antihumano de pollo conjugado con fosfatasa alcalina (obtenido de Immunsystem, Uppsala, Suecia) y se mide usando el p-nitrofenil fosfato del sustrato colorimétrico.

Ensayo C4 sobre manano: el ensayo descrito anteriormente está adaptado para medir la activación de la vía de la lectina a través de MBL recubriendo la placa con LSP y manano antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de la MASP-2.

20 Ensayo de C4 sobre H-ficolina (Hakata Ag): el ensayo descrito anteriormente se adapta para medir la activación de la vía de la lectina mediante H-ficolina, recubriendo la placa con LPS y H-ficolina antes de añadir suero mezclado con diversos agentes inhibidores de la MASP-2.

#### Ejemplo 10

25 El siguiente ensayo se usa para probar si un agente inhibidor de la MASP bloquea la vía clásica, analizando el efecto de un agente inhibidor de la MASP en condiciones en las que la vía clásica se inicia mediante complejos inmunes.

30 Métodos: para evaluar el efecto de un agente inhibidor de la MASP sobre las condiciones de activación del complemento cuando la vía clásica se inicia por complejos inmunes, se incuban unas muestras por triplicado de 50  $\mu\text{l}$  que contienen un 90 % de NHS, a 37 °C, en presencia de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de complejo inmunitario o PBS, y también se incluyen muestras por triplicado en paralelo (+/- inmunocomplejos), que contienen anticuerpo monoclonal anti-properidina 200 nM durante la incubación a 37 °C. Después de una incubación de dos horas a 37 °C, se agrega EDTA 13 mM a todas las muestras para detener la activación adicional del complemento, y las muestras se enfrían inmediatamente a 5 °C. Las muestras se almacenan a -70 °C antes de analizarse para determinar los productos de activación del complemento (C3a y sC5b-9), usando kits ELISA (Quidel, Catálogo Nros. A015 y A009) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 35 Ejemplo 11

Este ejemplo describe la identificación de fragmentos de anticuerpo de la MASP-2 Fab2 de alta afinidad que bloquean la actividad de la MASP-2.

40 Antecedentes y justificación: la MASP-2 es una proteína compleja, con muchos dominios funcionales separados, que incluyen: uno o más sitios de unión para MBL y ficolinas, un sitio catalítico de serina proteasa, un sitio de unión para sustrato proteolítico C2, un sitio de unión para el sustrato proteolítico C4, un sitio de escisión de la MASP-2 para la autoactivación de zimógeno de la MASP-2 y dos sitios de unión de  $\text{Ca}^{++}$ . Se identificaron fragmentos del anticuerpo Fab2 que se unen con alta afinidad a la MASP-2, y los fragmentos de Fab2 identificados se analizaron en un ensayo funcional, para determinar si podían bloquear la actividad funcional de la MASP-2.

45 Para bloquear la actividad funcional de la MASP-2, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo Fab2 debe unirse e interferir con un epítipo estructural en la MASP-2, que se requiere para la actividad funcional MASP-2. Por lo tanto, muchos de los Fab2 MASP-2 de unión de alta afinidad o todos ellos son incapaces de inhibir la actividad funcional MASP-2, a menos que se unan a epítopos estructurales en MASP-2 que están directamente implicados en la actividad funcional MASP-2.

50 Se usó un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de la convertasa de la vía C3 de la lectina para evaluar la "actividad de bloqueo" de los Fab2 de la MASP-2. Se sabe que el papel fisiológico primario de la MASP-2 en la vía de la lectina es generar el siguiente componente funcional de la vía del complemento mediada por lectina, concretamente la C3 convertasa de la vía de la lectina. La C3 convertasa de la vía de la lectina es un complejo enzimático crítico (C4bC2a) que escinde proteolíticamente a C3 en C3a y C3b. La MASP-2 no es un componente estructural de la C3 convertasa de la vía de la lectina (C4bC2a); sin embargo, se requiere actividad funcional de la MASP-2 para generar los dos componentes de proteína (C4b, C2a) que comprenden la vía de la lectina C3 convertasa. Además, todas las actividades funcionales separadas de la MASP-2 enumeradas anteriormente parecen

ser necesarias para que la MASP-2 genere la C3 convertasa de la vía de la lectina. Por estas razones, se cree que un ensayo preferido para usar en la evaluación de la “actividad de bloqueo” de los Fab2 de la MASP-2 es un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de C3 convertasa de la vía de la lectina.

5 Generación de Fab2 de alta afinidad: se usó una biblioteca de presentación de fagos de secuencias de anticuerpos humanos de cadena ligera y pesada variables y tecnología de selección de anticuerpos automatizada para identificar aquellos Fab2 que reaccionan con ligandos de interés seleccionados para crear Fab2 de alta afinidad a la proteína de la MASP-2 de rata (ID. DE SEC. N.º 13). Se empleó una cantidad conocida de proteína de la MASP-2 de rata (1 mg, > 85 % de pureza) para la selección de anticuerpos. Se utilizaron tres rondas de amplificación para la selección de los anticuerpos con la mejor afinidad. Aproximadamente 250 hallazgos diferentes que expresaban fragmentos de anticuerpos se seleccionaron para el examen de ELISA. Los hallazgos de alta afinidad se secuenciaron posteriormente para determinar la singularidad de los diferentes anticuerpos.

Se purificaron cincuenta anticuerpos únicos MASP-2 y se usaron 250 µg de cada anticuerpo Fab2 purificado para la caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y la prueba funcional de la vía del complemento, como se describe con más detalle a continuación.

15 Ensayos utilizados para evaluar la actividad inhibidora (de bloqueo) de los Fab2 de la MASP-2

1. Ensayo para medir la inhibición de la formación de C3 convertasa de la vía de la lectina:

Antecedentes: La C3 convertasa de la vía de la lectina es el complejo enzimático (C4bC2a) que escinde proteolíticamente C3 en los dos potentes fragmentos proinflamatorios, anafilatoxina C3a y opsónica C3b. La formación de C3 convertasa parece ser un paso clave en la vía de la lectina en términos de mediar la inflamación. La MASP-2 no es un componente estructural de la C3 convertasa de la vía de la lectina (C4bC2a); por lo tanto, los anticuerpos de la MASP-2 (o Fab2) no inhibirán directamente la actividad de C3 convertasa preexistente. Sin embargo, se requiere actividad de la serina proteasa de la MASP-2 para generar los dos componentes de la proteína (C4b, C2a) que comprenden la C3 convertasa de la vía de la lectina. Por lo tanto, el Fab2 de la MASP-2, que inhibe la actividad funcional MASP-2 (es decir, que bloquea al Fab2 de la MASP-2) inhibirá la formación *de novo* de la C3 convertasa de la vía de la lectina. C3 contiene un grupo de tioéster inusual y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C3 por la C3 convertasa en este ensayo, el grupo tioéster en C3b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino sobre macromoléculas inmovilizadas en el fondo de los pocillos de plástico, a través de enlaces éster o amida, facilitando así la detección de C3b en el ensayo ELISA.

El manano de levadura es un activador conocido de la vía de la lectina. En el siguiente método para medir la formación de C3 convertasa, se incubaron pocillos de plástico recubiertos con manano durante 30 minutos a 37 °C, con suero de rata diluido para activar la vía de la lectina. Los pocillos se lavaron luego y se analizaron para determinar el C3b inmovilizado en los pocillos, usando métodos de ELISA estándar. La cantidad de C3b generada en este ensayo es un reflejo directo de la formación *de novo* de la C3 convertasa de la vía de la lectina. Los Fab2 de la MASP-2 a las concentraciones seleccionadas se pudieron a prueba en este ensayo por su capacidad para inhibir la formación de C3 convertasa y la consecuente generación de C3b.

Métodos:

Se incubaron placas Costar Medium Binding de 96 pocillos durante toda la noche, a 5 °C, con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 µg/50 µl/pocillo. Después de la incubación durante la noche, cada pocillo se lavó tres veces con 200 µl de PBS. Los pocillos se bloquearon luego con 100 µl/pocillo de albúmina de suero bovino al 1 % en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezcla suave. Cada pocillo se lavó tres veces con 200 µl de PBS. Las muestras de la MASP-2 Fab2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> que contenían tampón GVB (4,0 mM de barbital, 141 mM de NaCl, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,0 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % de gelatina, pH 7,4) a 5 °C. Se añadió un 0,5 % de suero de rata a las muestras anteriores a 5 °C y se transfirieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37 °C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo transfiriendo las placas del baño de agua a 37 °C a un recipiente que contenía una mezcla de hielo y agua. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 µl con PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05 % en PBS), luego se lavó dos veces con 200 µl de PBS. Se añadió una dilución de 100 µl/pocillo de 1:10.000 del anticuerpo primario (conejo C3c antihumano, DAKO A0062) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con mezcla suave. Cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa, American Qualex A102PU) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en un agitador con una mezcla suave. Cada pocillo se lavó cinco veces con 200 µl con PBS. 100 µl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción de la peroxidasa se detuvo mediante la adición de 100 T1/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M y se midió la OD<sub>450</sub>.

2. Ensayo para medir la inhibición de escisión de C4 dependiente de la MASP-2

Antecedentes: la actividad de la serina proteasa de la MASP-2 es altamente específica y solo se han identificado dos

sustratos proteicos para la MASP-2: el C2 y el C4. La escisión de C4 genera C4a y C4b. El Fab2 de la MASP-2 puede unirse a epítomos estructurales en la MASP-2 que están directamente implicados en la escisión de C4 (por ejemplo, el sitio de unión de la MASP-2 para C4; el sitio catalítico de la serina proteasa de MASP-2) y de ese modo inhibe la actividad funcional de escisión C4 de la MASP-2.

- 5 El manano de levadura es un activador conocido de la vía de la lectina. En el siguiente método para medir la actividad de escisión de C4 de la MASP-2, se incubaron pocillos de plástico recubiertos con manano durante 30 minutos, a 37 °C, con suero de rata diluido para activar la vía de la lectina. Dado que el anticuerpo primario utilizado en este ensayo ELISA solo reconoce al C4 humano, el suero de rata diluido también se complementó con C4 humano (1,0 µg/ml). Los pocillos se lavaron luego y se analizaron para el C4b humano inmovilizado en los pocillos usando métodos de ELISA estándar. La cantidad de C4b generada en este ensayo es una medida de la actividad de escisión de C4 dependiente de la MASP-2. El Fab2 de la MASP-2 a las concentraciones seleccionadas se sometió a prueba en este ensayo, para determinar la capacidad para inhibir la escisión de C4.

Métodos: se incubaron unas placas Costar Medium Binding de 96 pocillos durante toda la noche a 5 °C con manano diluido en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1,0 Tg/50 µl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 µl de PBS. Los pocillos se bloquearon luego con 100 µl/pocillo de albúmina de suero bovino al 1 % en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezcla suave. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 µl de PBS. Las muestras de la MASP-2 Fab2 se diluyeron a concentraciones seleccionadas en Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> que contenían tampón GVB (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, 0,1 % de gelatina, pH 7,4) a 5 °C. También se incluyó en estas muestras 1,0 µg/ml de C4 humano (Quidel). Se añadió suero de rata al 0,5 % a las muestras anteriores a 5 °C y se transfirieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 37 °C para permitir la activación del complemento. La reacción se detuvo transfiriendo las placas del baño de agua a 37 °C a un recipiente que contenía una mezcla de hielo y agua. Cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µl con PBS-Tween 20 (Tween 20 al 0,05 % en PBS), luego cada pocillo se lavó 2 veces con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de C4c anti-humano de pollo conjugado con biotina en una dilución de 1:700 (Immunsystem AB, Uppsala, Suecia) en PBS, que contenía 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, con una mezcla suave. Cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de 0,1 µg/ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Pierce Chemical n.º 21126) en PBS que contenía 2,0 mg/ml de BSA y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, en un agitador con mezcla suave. Cada pocillo se lavó 5 x 200 µl con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 16 min. La reacción de la peroxidasa se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M y se midió la OD<sub>450</sub>.

### 3. Ensayo de unión del Fab2 de la MASP-2 anti-rata a la MASP-2 "nativa" de la rata

Antecedentes: la MASP-2 generalmente está presente en el plasma como un complejo dimérico de MASP-2 que también incluye moléculas de lectina específicas (proteína de unión a manosa (MBL) y ficolinas). Por lo tanto, si uno está interesado en estudiar la unión del Fab2 de la MASP-2 a la forma fisiológicamente relevante de la MASP-2, es importante desarrollar un ensayo de unión en el que se use la interacción entre el Fab2 y la MASP-2 "nativa" en el plasma, en lugar de la MASP-2 recombinante purificada. En este ensayo de unión, el complejo de MASP-2 "nativa"-MBL del suero de rata al 10 % se inmovilizó primero en pocillos revestidos con manano. La afinidad de unión de varios Fab2 de la MASP-2 a la MASP-2 "nativa" inmovilizada se estudió utilizando una metodología ELISA estándar.

Métodos: se incubaron unas placas Costar High Binding de 96 pocillos, durante la noche a 5 °C con manano diluido en tampón carbonato 50 mM, pH 9,5 a 1 µg/50 µl/pocillo. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 µl de PBS. Los pocillos se bloquearon con 100 µl/pocillo de leche en polvo descremada al 0,5 % en PBST (PBS con Tween 20 al 0,05 %) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla suave. Cada pocillo se lavó 3 veces con 200 µl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca<sup>++</sup> (solución salina tamponada con Tris, Tween 20 al 0,05 %, que contenía CaCl<sub>2</sub> 5,0 mM, pH 7,4. Se preparó el suero de rata al 10 % en tampón de unión con alto contenido de sal (Tris 20 mM) NaCl 1,0 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton-X100 al 0,05 %, albúmina de suero bovino al 0,1 % (p/v), pH 7,4) en hielo. Se añadieron 100 µl/pocillo y se incubaron durante la noche a 5 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado TBS/Tween/Ca<sup>++</sup>. Los pocillos se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de la concentración seleccionada del Fab2 de la MASP-2 diluido en Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> que contenía tampón GVB (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, 0,1 % de gelatina, pH 7,4) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con mezcla suave. Cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µl de PBS. Se incorporaron 100 µl/pocillo de anti-Fab2 de cabra conjugado con HRP (Biogenesis Cat No 0500-0099) diluido 1:5000 en 2,0 mg/ml de albúmina de suero bovino en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, con mezcla suave. Cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µl de PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo del sustrato de peroxidasa TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 70 minutos. La reacción de la peroxidasa se detuvo añadiendo 100 µl/pocillo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M y se midió la OD<sub>450</sub>.

Resultados:

Se escogieron aproximadamente 250 Fab2 diferentes que reaccionaron con alta afinidad a la proteína de la MASP-2 de rata para el cribado por ELISA. Estos Fab2 de alta afinidad se secuenciaron para determinar la unicidad de los

diferentes anticuerpos, y se purificaron 50 anticuerpos únicos de la MASP-2 para su posterior análisis. Se usaron 250 µg de cada anticuerpo Fab2 purificado para la caracterización de la afinidad de unión a MASP-2 y la prueba funcional de la vía del complemento. Los resultados de este análisis se muestran a continuación en la tabla 13.

**Tabla 13:** FAB2 de la MASP-2 que bloquean la activación del complemento de la vía de la lectina

Anticuerpo Fab2 número	C3 Convertasa (IC <sub>50</sub> (nM))	K <sub>d</sub> (nM)	Escisión de C4 IC <sub>50</sub> (nM)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 nM
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 nM
40	1,1	7,2	0,68
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 nM
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 nM
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

5

Como se muestra más arriba en la tabla 13, de los 50 Fab2 de la MASP-2 probados, 17 se identificaron como Fab2 bloqueadores de la MASP-2 que inhiben con gran potencia la formación de la C3 convertasa con una IC<sub>50</sub> igual o inferior a Fab2 10 nM (un tasa de aciertos positiva del 34 %). Ocho de los 17 Fab2 identificados tienen la IC<sub>50</sub> en el intervalo subnanomolar. Además, los diecisiete Fab2 de bloqueo de la MASP-2 mostrados en la tabla 13 proporcionaron una inhibición esencialmente completa de la formación de C3 convertasa en el ensayo de convertasa de la vía de la lectina C3. Esta es una consideración importante, ya que es teóricamente posible que un Fab2 "bloqueador" solo pueda inhibir fraccionalmente la función de la MASP-2, incluso cuando cada molécula de la MASP-2 esté unida por Fab2.

10

Aunque el manano es un activador conocido de la vía de la lectina, es teóricamente posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de la rata también active la vía clásica y genere C3b a través de la C3 convertasa de la vía clásica. Sin embargo, cada uno de los diecisiete Fab2 bloqueadores de la MASP-2 listados en este ejemplo inhibe potentemente la generación de C3b (> 95 %), lo que demuestra la especificidad de este ensayo para la C3 convertasa de la vía de la lectina.

15

También se realizaron ensayos de unión con los diecisiete Fab2 bloqueadores para calcular un K<sub>d</sub> aparente para cada uno. Los resultados de los ensayos de unión de los Fab2 de la MASP-2 anti-rata a la MASP-2 nativa de rata para seis de los Fab2 bloqueadores también se muestran en la tabla 13. Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de unión similares para los otros Fab2, cuyos resultados se muestran en la tabla 13. En general, las K<sub>d</sub> aparentes obtenidas para la unión de cada uno de los seis Fab2 a la MASP-2 "nativa" se corresponden razonablemente bien con la IC<sub>50</sub> para el Fab2 en el ensayo funcional de la C3 convertasa. Existe evidencias de que la MASP-2 sufre un cambio conformacional de una forma "inactiva" a una forma "activa", tras la activación de su actividad de la proteasa (Feinberg y col., *EMBO J.* 22: 2348-59 (2003); Gal y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 280: 33435 - 44 (2005)). En el plasma de rata normal utilizado en el ensayo de formación de la C3 convertasa, la MASP-2 está presente

20

25

principalmente en la conformación de zimógeno 'inactivo'. Por el contrario, en el ensayo de unión, la MASP-2 está presente como parte de un complejo con MBL unido a manano inmovilizado; por lo tanto, la MASP-2 estaría en la conformación "activa" (Petersen y colaboradores, *J Immunol Methods* 257: 107 - 16, 2001). En consecuencia, uno no necesariamente esperaría una correspondencia exacta entre la  $IC_{50}$  y  $K_d$  para cada uno de los diecisiete Fab2 de bloqueo probados en estos dos ensayos funcionales porque, en cada ensayo, el Fab2 se uniría a una forma conformacional diferente de la MASP-2. Sin embargo, con la excepción del Fab2 # 88, parece haber una correspondencia razonablemente estrecha entre la  $IC_{50}$  y la  $K_d$  aparente para cada uno de los otros dieciséis Fab2 evaluados en los dos ensayos (véase la tabla 13).

Varios de los Fab2 bloqueadores se evaluaron para determinar la inhibición de escisión de C4 mediada por la MASP-2. Como se muestra en la tabla 13, se encontró que todos los Fab2 probados inhibían la escisión de C4 con  $IC_{50}$  similares a las obtenidos en el ensayo de C3 convertasa.

Aunque el manano es un activador conocido de la vía de la lectina, teóricamente es posible que la presencia de anticuerpos anti-manano en el suero de la rata también active la vía clásica y por ende, genere C4b por escisión de C4 mediada por C1s. Sin embargo, se han identificado varios Fab2 de la MASP-2 que inhiben de un modo potente la generación de C4b (> 95 %), lo que demuestra la especificidad de este ensayo para la escisión de C4 mediada por la MASP-2. C4, como C3, contiene un grupo de tioéster inusual y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C4 por la MASP-2 en este ensayo, el grupo tioéster en C4b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas en el fondo de los pocillos de plástico, a través de enlaces éster o amida, lo que facilita la detección de C4b en el ensayo ELISA.

Estos estudios demuestran claramente la creación de FAB2 de alta afinidad para la proteína de la MASP-2 de rata que bloquea funcionalmente tanto la actividad C3 convertasa como la C4 convertasa, evitando así la activación de la vía de la lectina.

#### Ejemplo 12

Este ejemplo describe el mapeo de epítomos para varios de los anticuerpos Fab2 de la MASP-2 anti-rata bloqueadores que se generaron como se describe en el ejemplo 11.

#### Métodos:

Las siguientes proteínas, todas con etiquetas 6X His N-terminales, se expresaron en células CHO utilizando el vector pED4:

MASP-2A de rata, una proteína de la MASP-2 de longitud completa, inactivada por alteración de la serina en el centro activo a alanina (S613A);

MASP-2K de rata, una proteína de la MASP-2 de longitud completa, alterada para reducir la autoactivación (R424K);

CUBI-II, un fragmento N-terminal de la MASP-2 de rata que contiene los dominios CUBI, símil EGF y CUBII solamente y

CUBI/símil EGF, un fragmento N-terminal de la MASP-2 de rata que contiene solo los dominios CUBI y símil EGF.

Estas proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad de níquel, como se describió previamente (Chen y colaboradores, *J Biol. Chem.* 276: 25894-02 (2001)).

Un polipéptido C-terminal (CCPII-SP), que contiene CCPII y el dominio de serina proteasa de la MASP-2 de rata, se expresó en el *E. coli* como una proteína de fusión de tiorredoxina, usando pTrxFus (Invitrogen). La proteína se purificó a partir de lisados celulares usando resina de afinidad Thiobond. La contrapartida de fusión de tiorredoxina se expresó a partir de pTrxFus vacío, como control negativo.

Todas las proteínas recombinantes se dializaron en tampón TBS y sus concentraciones se determinaron midiendo la DO a 280 nm.

#### Análisis Dot Blot:

Unas diluciones seriadas de los cinco polipéptidos de MASP-2 recombinantes descritos anteriormente (y el polipéptido de tiorredoxina como un control negativo para el polipéptido de CCPII-serina-proteasa) se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa. La cantidad de proteína detectada varió de 100 ng a 6,4 pg, en etapas de cinco pasos. En experimentos posteriores, la cantidad de proteína detectada varió de 50 ng a 16 pg, nuevamente en etapas de cinco. Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % en TBS (tampón de bloqueo) y después se incubaron con 1,0  $\mu$ g/ml de Fab2 de MASP-2 en tampón de bloqueo (que contenía  $Ca^{++}$  5,0 mM). Los Fab2 unidos se detectaron utilizando Fab antihumano conjugado con HRP (AbD/Serotec, diluido 1/10.000) y un kit de detección de ECL (Amersham). Se incubó una membrana con anticuerpo policlonal anti-MASP-2 de conejo-humano (descrito en Stover y colaboradores, *J. Immunol* 163: 6848-59 (1999)) como control positivo. En este caso,

el Ab unido se detectó usando IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP (Dako, diluido 1/2.000).

Ensayo de unión de la MASP-2:

5 Las placas de ELISA se recubrieron con 1,0 µg/pocillo de polipéptido de la MASP-2A o CUBI-II recombinante en tampón de carbonato (pH 9,0) durante la noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % en TBS, luego se añadieron diluciones en serie de los Fab2 de la MASP-2 en TBS que contenía Ca<sup>++</sup> 5,0 mM. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con TBS/Tween/Ca<sup>++</sup>, se añadió Fab anti-humano conjugado con HRP (AbD/Serotec) diluido 1/10.000 en TBS/Ca<sup>++</sup>, y las placas se incubaron durante otra hora más a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó utilizando un kit de sustrato de peroxidasa de TMB (Biorad).

10 Resultados:

15 Los resultados del análisis de transferencia puntual que demuestra la reactividad de los Fab2 con diversos polipéptidos MASP-2 se proporcionan a continuación en la tabla 14. Los valores numéricos proporcionados en la tabla 14 indican la cantidad de proteína manchada requerida para proporcionar aproximadamente la mitad de la potencia de señal máxima. Como se muestra, todos los polipéptidos (a excepción de la contrapartida de fusión de tiorredoxina sola) fueron reconocidos por el control positivo Ab (sueros policlonales anti-MASP-2 humanos, hallados en conejos).

Tabla 14: reactividad con diversos polipéptidos de la MASP-2 recombinantes en *dot blots*

Anticuerpo Fab2 número	MASP-2A	CUBI-II	Tipo CUBI/ EGF	CCPII-SP	Tiorredoxina
					20
40	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
41	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
11	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR
49	0,16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0,16 ng	NR	NR	0,8 ng	NR 25
57	0,032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
60	0,4 ng	0,4 ng	NR	NR	NR
63	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
66	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR 30
67	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
71	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
81	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
86	0,4 ng	NR	NR	10 ng	NR 35
87	0,4 ng	NR	NR	2,0 ng	NR
Control positivo	<0,032 ng	0,16 ng	0,16 ng	<0,032 ng	NR

NR =  
no  
reactio  
n, sin

40 reacción. El anticuerpo del control positivo está representado por sueros de la MASP-2 anti-humana policlonal.

45 Todos los Fab2 reaccionaron con MASP-2A y MASP-2K (datos no mostrados). La mayoría de los Fab2 reconocieron el polipéptido CCPII-SP pero no los fragmentos N-terminales. Las dos excepciones son Fab2 número 60 y Fab2 número 57. El Fab2 # 60 reconoce a MASP-2A y al fragmento CUBI-II, pero no al polipéptido CUBI/EGF o al polipéptido CCPII-SP, lo que sugiere que se une a un epítipo en CUBII, o que abarca el CUBII y el dominio similar al

EGF. El Fab2 número 57 reconoce a MASP-2A pero no a ninguno de los fragmentos MASP-2 probados, lo que tal vez indica que este Fab2 reconoce un epítipo en CCP1. Los Fab2 número 40 y número 49 se unieron solo para completar la MASP-2A. En el ensayo de unión de ELISA, el Fab2 número 60 también se une al polipéptido CUBI-II, aunque con una afinidad aparente ligeramente inferior (datos no mostrados).

- 5 Estos hallazgos demuestran la identificación de Fab2 bloqueadores únicos en múltiples regiones de la proteína de la MASP-2.

#### Ejemplo 13

Este ejemplo describe el análisis farmacodinámico de anticuerpos de Fab2 de la MASP-2 de alta afinidad representativos, que se identificaron como se describe en el ejemplo 11.

- 10 Antecedentes/justificación:

Como se describe en el ejemplo 11, para identificar anticuerpos de alta afinidad que bloquean la vía de la lectina de rata, se utilizó la proteína de la MASP-2 de rata para explorar una biblioteca de presentación de fagos. Esta biblioteca se diseñó para proporcionar una alta diversidad inmunológica y se construyó usando secuencias de genes de inmunoglobulina completamente humanas. Como se muestra en el ejemplo 11, se identificaron alrededor de 250 clones de fagos individuales que se unieron con alta afinidad a la proteína de la MASP-2 de rata por cribado de ELISA. El secuenciamiento de estos clones identificó 50 fagos únicos que codifican anticuerpos MASP-2. La proteína del Fab2 se expresó a partir de estos clones, se purificó y se analizó para determinar la afinidad de unión a la MASP-2 y la inhibición funcional de la vía del complemento de la lectina.

Como se muestra en la tabla 13 del ejemplo 11, se identificaron 17 Fab2 de la MASP-2 con actividad de bloqueo funcional, como resultado de este análisis (una tasa de acierto del 34 % para bloquear anticuerpos). La inhibición funcional de la vía del complemento de lectina por los Fab2 fue evidente a nivel de depósito de C4, que es una medida directa de la escisión de C4 por la MASP-2. Es importante destacar que la inhibición fue igualmente evidente cuando se evaluó la actividad de la C3 convertasa, lo que demuestra el bloqueo funcional de la vía del complemento de la lectina. Los 17 Fab2 de bloqueo de la MASP-2 identificados como se describe en el ejemplo 11 inhiben con gran potencia la formación de C3 convertasa, con valores de IC<sub>50</sub> iguales o inferiores a 10 nM. Ocho de los 17 Fab2 identificados tienen valores IC<sub>50</sub> en el intervalo sub-nanomolar. Además, los 17 Fab2 del bloqueo de la MASP-2 proporcionaron una inhibición esencialmente completa de la formación de C3 convertasa en el ensayo de C3 convertasa de la vía de la lectina, como se resume en la tabla 13 del ejemplo 11. Además, cada uno de los 17 Fab2 bloqueadores de la MASP-2 mostrados en la tabla 13 inhiben con gran potencia la generación de C3b (> 95 %), lo que demuestra la especificidad de este ensayo para la C3 convertasa de la vía de la lectina.

Las variantes isotópicas del anticuerpo de longitud completa de IgG2c e IgG2a de ratón se obtuvieron del Fab2 número 11. Este ejemplo describe la caracterización *in vivo* de estos isotipos para parámetros farmacodinámicos.

#### Métodos:

Como se describe en el ejemplo 11, la proteína de la MASP-2 de rata se utilizó para analizar una biblioteca de presentación de fagos Fab, a partir de la cual se identificó Fab2 número 11. Las variantes isotópicas del anticuerpo de IgG2c e IgG2a de ratón de longitud completa se obtuvieron del Fab2 número 11. Ambos isotipos de IgG2c de ratón y de IgG2a de ratón de longitud completa se caracterizaron *in vivo* por parámetros farmacodinámicos de la siguiente manera.

#### Estudio *in vivo* en ratones:

Se llevó a cabo un estudio farmacodinámico en ratones para investigar el efecto de la dosificación del anticuerpo de la MASP-2 en la actividad de la vía de la lectina en plasma *in vivo*. En este estudio, el depósito de C4 se midió *ex vivo* en un ensayo de la vía de la lectina en diversos momentos, después de la administración subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP) de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg del MoAb de la MASP-2 de ratón (isotipo de anticuerpo de longitud completa de IgG2a de ratón derivado del Fab2 número 11). La figura 29A ilustra esquemáticamente el depósito de C4b específico de la vía de la lectina sobre una placa de microtitulación revestida con zimosano, medida *ex vivo* en muestras de suero no diluido tomadas de ratones (n = 3 ratones/grupo) en diversos momentos después de la dosificación subcutánea de 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de MoAb de MASP-2 de ratón. Las muestras de suero de ratones recogidos antes de la dosificación de anticuerpos sirvieron como controles negativos (100 % de actividad), mientras que el suero suplementado *in vitro* con 100 nM del mismo anticuerpo de bloqueo MASP-2 se usó como control positivo (0 % de actividad).

Los resultados mostrados en la figura 29A demuestran una inhibición rápida y completa del depósito de C4b después de la administración subcutánea de una dosis de 1,0 mg/kg del MoAb de la MASP-2 de ratón. Se observó una inhibición parcial del depósito de C4b después de la administración subcutánea de una dosis de 0,3 mg/kg del MoAb de la MASP-2 de ratón.

Se siguió el curso del tiempo de la recuperación de la vía delectina durante tres semanas después de una sola administración IP del MoAb de la MASP-2 de ratón, a razón de 0,6 mg/kg en ratones. Tal como se muestra en la figura 29B, se produjo una caída precipitada en la actividad de la vía de la lectina después de la dosificación del anticuerpo seguido de la inhibición completa de la vía de la lectina, que duró aproximadamente 7 días después de la administración IP. Se observó una restauración lenta de la actividad de la vía de la lectina durante la segunda y la tercera semanas, con una restauración completa de la vía de la lectina en los ratones 17 días después de la administración de MoAb de la MASP-2.

Estos resultados demuestran que el MoAb de la MASP-2 de ratón derivado de Fab2 n. ° 11 inhibe la vía de la lectina de los ratones de una manera sensible a la dosis cuando se administra sistémicamente.

#### 10 Ejemplo 14

Este ejemplo describe la identificación, utilizando presentación en fagos, de anticuerpos scFv completamente humanos que se unen a la MASP-2 e inhiben la activación del complemento mediada por lectina (LEA-2), dejando intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario.

Generalidades:

15 Se identificaron anticuerpos MASP-2 de alta afinidad, completamente humanos, seleccionando una biblioteca de presentación en fago. Los fragmentos variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos se aislaron tanto en formato scFv como en formato de IgG de longitud completa. Los anticuerpos de la MASP-2 humanas son útiles para inhibir la lesión celular asociada con la activación de la vía del complemento alternativa mediada por la vía de la lectina, al tiempo que dejan intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario. En algunos casos, los anticuerpos inhibidores de la MASP-2 del sujeto tienen las siguientes características: (a) alta afinidad por la MASP-2 humana (por ejemplo, una  $K_D$  de 10 nM o menos) y (b) inhiben la actividad del complemento dependiente de la MASP-2 en suero humano al 90 %, con una  $IC_{50}$  de 30 nM o menos.

Métodos:

Expresión de la MASP-2 catalíticamente inactiva de longitud completa:

25 La secuencia de ADNc de longitud completa de la MASP-2 humana (ID. DE SEC. N.º 4), que codifica el polipéptido de la MASP-2 humana con secuencia líder (ID. DE SEC. N.º 5) se subclonó en el vector de expresión de mamífero pCI-Neo (Promega), que impulsa la expresión eucariota bajo el control de la región potenciadora/promotora del CMV (descrita en Kaufinan RJ y col., *Nucleic Acids Research* 19: 4485-90, 1991; Kaufinan, *Methods in Enzymology*, 185: 537-66 (1991)).

30 Para generar proteína de la MASP-2A humana catalíticamente inactiva, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describe en el documento de patente de los EE. UU. con el número US2007/0172483. Los productos de PCR se purificaron después de la electroforesis en gel de agarosa y la preparación de bandas y la superposición de adenosina única se generaron usando un procedimiento estándar. La MASP-2A con cola de adenosina se clonó entonces en el vector pGEM-T y se transformó en *E. coli*. La MASP-2A humana se subclonó adicionalmente en cualquiera de los vectores de expresión de mamífero pED o pCI-Neo.

40 El constructo de expresión de la MASP-2A descrito anteriormente se transfectó en células DXB1, usando el procedimiento de transfección de fosfato de calcio estándar (Maniatis y colaboradores, 1989). La MASP-2A se produjo en medio libre de suero para asegurarse de que las preparaciones no estuvieran contaminadas con otras proteínas séricas. Se recolectó el medio de células confluentes cada dos días (cuatro veces en total). El nivel de la MASP-2A recombinante promedió aproximadamente 1,5 mg/litro de medio de cultivo. La MASP-2A (mutante Ser-Ala descrito anteriormente) se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de MBP-A-agarosa

ELISA de la MASP-2A en clones candidatos del ScFv identificados por paneo/conversión de scFv y cribado por filtros

45 Una biblioteca de presentación en fagos de secuencias de región variable de la cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina humana se sometió a un paneo de antígenos, seguido de cribado y selección automatizados de anticuerpos, para identificar anticuerpos scFv de alta afinidad a la proteína de la MASP-2 humana. Se llevaron a cabo tres rondas de selección de la biblioteca de fagos scFv frente a MASP-2A marcada con HIS o etiquetada con biotina. La tercera ronda de selección se eluyó primero con MBL y luego con TEA (alcalina). Para controlar el enriquecimiento específico de fagos que presentaban fragmentos scFv contra la MASP-2A diana, se llevó a cabo un estudio ELISA de fagos policlonales contra la MASP-2A inmovilizada. Los genes scFv de la ronda 3 del paneo se clonaron en un vector de expresión pHOG y se ejecutaron en un cribado por filtros de pequeña escala, para buscar clones específicos contra la MASP-2A.

Se recogieron colonias bacterianas que contenían plásmidos que codificaban fragmentos de scFv de la tercera ronda del paneo, se distribuyeron a modo de grilla en membranas de nitrocelulosa y se cultivaron durante la noche

en un medio no inductor para producir placas maestras. Se recogieron en total 18.000 colonias y se las analizó a partir de la tercera ronda de paneo; la mitad de la elución competitiva y la mitad de la elución de TEA subsiguiente. El paneo de la biblioteca de fagémidos scFv contra la MASP-2A seguido de la conversión de scFv y un cribado por filtros produjo 137 clones positivos. 108/137 clones fueron positivos en un ensayo ELISA para la unión de la MASP-2 (datos no mostrados), de los cuales 45 clones se analizaron adicionalmente para determinar la capacidad de bloquear la actividad de la MASP-2 en el suero humano normal.

Ensayo para medir la inhibición de la formación de la C3 convertasa de la vía de la lectina

Se usó un ensayo funcional que mide la inhibición de la formación de la C3 convertasa de la vía de la lectina para evaluar la "actividad de bloqueo" de los clones candidatos de scFv de la MASP-2. Se requiere la actividad de la serina proteasa de la MASP-2 para generar los dos componentes de la proteína (C4b, C2a) que comprenden la C3 convertasa de la vía de la lectina. Por lo tanto, un scFv de MASP-2 que inhiba la actividad funcional de la MASP-2 (es decir, un scFv bloqueador de la MASP-2) inhibirá la formación *de novo* de la C3 convertasa de la vía de la lectina. C3 contiene un grupo de tioéster inusual y altamente reactivo como parte de su estructura. Tras la escisión de C3 por la C3 convertasa en este ensayo, el grupo tioéster en C3b puede formar un enlace covalente con grupos hidroxilo o amino en macromoléculas inmovilizadas en el fondo de los pocillos de plástico, a través de enlaces éster o amida, facilitando así la detección de C3b en el ensayo ELISA.

El manano de la levadura es un activador conocido de la vía de la lectina. En el siguiente método para medir la formación de C3 convertasa, se incubaron pocillos de plástico recubiertos con manano con suero humano diluido para activar la vía de la lectina. Los pocillos se lavaron luego y se analizaron para ver los C3b inmovilizados en los pocillos, usando métodos de ELISA estándar. La cantidad de C3b generada en este ensayo es un reflejo directo de la formación *de novo* de la C3 convertasa de la vía de la lectina. Los clones de scFv de la MASP-2 a las concentraciones seleccionadas se analizaron en este ensayo por su capacidad para inhibir la formación de C3 convertasa y la consecuente generación de C3b.

Métodos:

Los 45 clones candidatos identificados como se describió anteriormente se expresaron, purificaron y diluyeron a la misma concentración madre, que se diluyó de nuevo en  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  que contenía tampón GVB (barbital 4,0 mM, NaCl 141 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,0 mM, 0,1 % gelatina, pH 7,4) para asegurar que todos los clones tuvieran la misma cantidad de tampón. Los clones de scFv se probaron cada uno por triplicado, a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El control positivo OMS100 Fab2 y se probó a 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La formación de C3c se controló en presencia y en ausencia de los clones de scFv/IgG.

El manano se diluyó a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (1  $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ ) en tampón carbonato 50 mM ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM +  $\text{NaHCO}_3$  35 mM +  $\text{NaN}_3$  1,5 mM), pH 9,5 y se recubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas recubiertas con manano se lavaron 3 veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de bloqueo de HSA al 1 % a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS, y se conservaron en hielo con 200  $\mu\text{l}$  de PBS hasta la adición de las muestras.

Se diluyó suero humano normal al 0,5 % en tampón CaMgGVB, y se añadieron los clones de scFv o el control positivo OMS100 Fab2 por triplicado a 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (solo el control OMS100) y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a este tampón y se preincubaron durante 45 minutos en hielo antes de la adición a la placa de ELISA bloqueada. La reacción se inició mediante incubación durante una hora a 37 °C y se detuvo transfiriendo las placas a un baño de hielo. El depósito de C3b se detectó con un anticuerpo Rabbit  $\alpha$ -Mouse C3c seguido de Goat  $\alpha$ -Rabbit HRP. El control negativo fue tampón sin anticuerpo (sin anticuerpo = depósito máximo de C3b), y el control positivo fue tampón con EDTA (sin depósito de C3b). La referencia se determinaba llevando a cabo el mismo ensayo, excepto que los pocillos estaban libres de manano. La señal de referencia contra las placas sin manano se resta de las señales en los pocillos que contienen manano. Se estableció un criterio de corte a la mitad de la actividad de un clon scFv irrelevante (VZV) y tampón solo.

Resultados: con base en el criterio de corte, se encontraron 13 clones en total para bloquear la actividad de la MASP-2. Los 13 clones que producen > 50 % de supresión de la vía se seleccionaron y se secuenciaron, produciendo 10 clones únicos. Se encontró que los diez clones tenían la misma subclase de cadena ligera,  $\lambda 3$ , pero tres subclases de cadena pesada diferentes: VH2, VH3 y VH6. En el ensayo funcional, cinco de los diez clones scFv candidatos arrojaron valores de  $\text{IC}_{50}$  nM menores que los criterios objetivo 25 nM usando suero humano al 0,5 %.

Para identificar aquellos anticuerpos que tuvieran una potencia mejorada, los tres clones de scFv madre, identificados como se describió anteriormente, se sometieron a una mezcla de cadena ligera. Este proceso implicó la generación de una biblioteca combinatoria que consistía en la VH de cada uno de los clones madre emparejados con una biblioteca de cadenas ligeras lambda humanas, naïve (VL), derivadas de seis donantes sanos. Esta biblioteca se cribó luego para clones de scFv con una afinidad de enlace y/o una mejor funcionalidad.

Tabla 15: comparación de la potencia funcional en IC<sub>50</sub> (nM) de los clones hijos líderes y de sus respectivos clones madre (todos en formato scFv).

Clon de scFv	Ensayo de C3 en suero humano al 1 % (IC <sub>50</sub> nM)	Ensayo de C3 en suero humano al 90 % (IC <sub>50</sub> nM)	Ensayo de C3 en suero humano al 90 % (IC <sub>50</sub> nM)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

5 A continuación se presentan las secuencias de la región variable de la cadena pesada (VH) para los clones madre y los clones hijos mostrados anteriormente en la tabla 15, y enumerados a continuación en las tablas 16A-F.

Las CDR de Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3)) están en negrita; y las CDR de Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) y 95-101 (H3)) están subrayadas.

10 17D20\_35VH-21N11VL región variable de la cadena pesada (VH) (ID. DE SEC. N.º 15, codificada por la ID. DE SEC. N.º 14)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL**SRGKMGV**SWIRQPPGKALEW  
**LAHIFSSDEKSYRTSLK**SRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVD**TATYYCAR**IRRG  
 GIDYWGQGLTVSS

d17N9 región variable de cadena pesada (VH) (ID. DE SEC. N.º 16)

QVQLQQSGPGLVKPSQTL**SLTCAISGDSVSSTSA**AWN**WIRQSPSRGLEW****LGRTY**  
**YRSK**WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPED**TA**VYY**CARD**PFQVVPF  
 DIWGQGMVTVSS

Región variable de cadena pesada

15 Tabla 16A: cadena pesada (aa 1-20)

Cadena pesada																				
aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
d3521N11 (SEC.:15)	Q	V	T	L	K	E	S	G	P	V	L	V	K	P	T	E	T	L	T	L
d17N9 (SEC.:16)	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L

Tabla 16B: cadena pesada (aa 21-40)

ES 2 670 668 T3

Cadena pesada	CDR-HI																			
aa	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
d3521N11 (SEC.:15)	T	C	T	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	K	M	G	V	S	W	I	R
d17N9 (SEC.:16)	T	E	A	I	S	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	S	A	A	W	N	W	I	R

Tabla 16C: cadena pesada (aa 41-60)

Cadena pesada	CDR-H2																			
aa	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
d3521N11 (SEC.:15)	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	A	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	D	E	K	S
d17N9 (SEC.:16)	Q	S	P	S	R	G	L	E	W	L	G	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	S	K	W	Y

Tabla 16D: cadena pesada (aa 61-80)

Cadena pesada	CDR-H2 (cont.)																			
aa	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
d3521N11 (SEC.:15)	Y	R	T	S	L	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	V
d17N9 (SEC.:16)	N	D	Y	A	V	S	V	K	S	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N

Tabla 16E: cadena pesada (aa 81-100)

Cadena pesada	CDR-H3																			
aa	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
d3521N11 (SEC.:15)	V	L	T	M	T	N	M	D	P	V	D	T	A	T	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>I</u>
d17N9 (SEC.:16)	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	T	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>A</u>

Tabla 16F: cadena pesada (aa 101-118)

Cadena pesada	CDR-H3 (cont.)																			
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
aa																				
d3521N11 (SEC.:15)	<b>R</b>	<b>R</b>	G	G	I	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
d17N9 (SEC.:16)	<b>R</b>	<b>D</b>	P	F	G	V	P	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S

A continuación se presentan las secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL) para los clones madre y los clones hijos enumerados a continuación en las Tablas 17A-F.

5 Las CDR de Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2) y 89-97 (L3) están en negrita, y las CDR de Chothia (24-34 (L1); 50-56 (L2) y 89-97 (L3) están subrayadas. Estas regiones son las mismas, ya sea que estén numeradas por el sistema Kabat o Chothia.

17D20m d3521N11 región variable de cadena ligera (VL) (ID. DE SEC. N.º 17)

QPVLTPPPSLVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQ**  
**DKQRPSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAVF**GGG**TKL**  
 TVL

17N16m d17N9 región variable de cadena ligera (VL) (ID. DE SEC. N.º 19, codificada por la ID. DE SEC. N.º 18)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITC**AGDNLGKKRVHWY**QQRPGQAPVLVIYD  
**DSDRPSG**IPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGT  
 KLTVLAAAGSEQ**KLISE**

10

Tabla 17A: cadena ligera (aa 1-20)

Cadena ligera	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
aa																				
d3521N11 (SEC.: 17)	Q	P	V	L	T	Q	P	P	S	<b>L</b>	S	V	S	P	G	Q	T	A	S	I
d17N9 (SEC.:19)	S	Y	<b>E</b>	L	<b>I</b>	Q	P	P	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	<b>T</b>	I

Tabla 17B: cadena ligera (aa 21-40)

Cadena ligera	CDR-L1																			
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
aa																				
d3521N11 (SEC.: 17)	T	E	S	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>W</b>	Y	Q	Q	K	P	G
d17N9 (SEC.:19)	T	C	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>W</b>	Y	Q	Q	<b>R</b>	P	G

Tabla 17C: cadena ligera (aa 41-60)

Cadena ligera	CDR-L2																			
aa	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
d3521N11 (SEC.: 17)	Q	S	P	V	L	V	M	Y	Q	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	I	P	E	R
d17N9 (SEC.:19)	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	I	P	D	R

Tabla 17D: cadena ligera (aa 61-80)

Cadena ligera	CDR-L2 (cont.)																			
aa	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
d3521N11 (SEC.: 17)	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	M
d17N9 (SEC.:19)	F	S	A	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	T	R	G	E	A	G

5 Tabla 17E: cadena ligera (aa 81-100)

Cadena ligera	CDR-L3																			
aa	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
d3521N11 (SEC.: 17)	D	X	A	D	Y	Y	C	Q	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	I	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	G	G	G
d17N9 (SEC.:19)	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>D</u>	I	A	I	<u>D</u>	H	<u>V</u>	V	F	G

Tabla 17F: cadena ligera (aa 101-120)

Cadena ligera	CDR-L3 (cont.)																			
aa	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
d3521N11 (SEC.: 17)	T	K	L	T	V	L	A	A	A	G	S	E	Q	K	L	I	S	E	E	D
d17N9 (SEC.:19)	G	G	T	K	L	T	V	L	A	A	A	G	S	E	Q	K	L	I	S	E

10 Los anticuerpos de la MASP-2 OMS100 y MoAb\_d3521N1LVL que, según se ha demostrado, se unen a la MASP-2 humana con alta afinidad y tienen la capacidad de bloquear la actividad del complemento funcional, se analizaron

con respecto a la unión del epítipo por análisis *dot blot*. Los resultados muestran que los anticuerpos d3521N11 y OMS100 son altamente específicos para la MASP-2 y no se unen a la MASP-1/3. Ningún anticuerpo se unió a MAP19 ni a los fragmentos de la MASP-2 que no contenían el dominio CCP1 de la MASP-2, lo que lleva a la conclusión de que los sitios de unión abarcan CCP1.

5 Por consiguiente, en un caso, un agente inhibidor de la MASP-2 para usar en las composiciones y los métodos de la invención reivindicada comprende un anticuerpo humano que se une a un polipéptido que consiste en MASP-2 humana (ID. DE SEC. N.º 3), en el que el anticuerpo comprende lo siguiente:

10 I) a) una región variable de la cadena pesada, que comprende: i) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos 31-35 de la ID. DE SEC. N.º 21; y ii) una CDR2 de cadena pesada, que comprende la secuencia de aminoácidos 50-65 de la ID. DE SEC. N.º 21; y iii) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos 95-102 de la ID. DE SEC. N.º 21 y

15 b) una región variable de la cadena ligera que comprende: i) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos 24-34 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y ii) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos 50-56 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; y iii) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos 89-97 de la ID. DE SEC. N.º 25 o de la ID. DE SEC. N.º 27; o II) una variante de ello, que por lo demás es idéntica a dichos dominios variables, excepto por un total combinado de hasta 6 sustituciones de aminoácidos dentro de dichas regiones CDR de dicha región variable de la cadena pesada y un total combinado de hasta 6 sustituciones de aminoácidos dentro de dichas regiones dichas regiones CDR de dicha región variable de la cadena ligera, en donde el anticuerpo o la variante de este inhibe la activación del complemento dependiente de la MASP-2.

20

#### Ejemplo 15

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos monoclonales de la MASP-1 y de la MASP-3 usando un sistema *in vitro* que comprende una línea celular DT40 modificada, la DTLacO.

#### Antecedentes/justificación:

25 Los anticuerpos contra la MASP-1 y la MASP-3 humanas se generaron usando un sistema *in vitro* que comprende una línea celular DT40 modificada, la DTLacO, que permite la inducción reversible de la diversificación de un polipéptido particular, como se describe además en los documentos de patente WO2009029315 y US2010093033. La DT40 es una línea de células B de pollo que, según se sabe, mutan constitutivamente sus genes de inmunoglobulina (Ig) de cadena pesada y ligera en cultivo. Al igual que otras células B, esta mutagénesis constitutiva se dirige a mutaciones en la región V de los genes de la Ig y, por lo tanto, a las CDR de las moléculas de los anticuerpos expresados. La mutagénesis constitutiva en células DT40 tiene lugar mediante la conversión génica, utilizando como secuencias donantes un conjunto de segmentos del gen V no funcional (genes pseudo-V;  $\Psi V$ ) situados cadena arriba de cada región V funcional. La eliminación de la región  $\Psi V$  mostró previamente que causaba un cambio en el mecanismo de diversificación, de la conversión de genes a la hipermutación somática, el mecanismo comúnmente observado en las células B humanas. Se ha demostrado que la línea de linfoma de células B de pollo, DT40, es un punto de partida prometedor para la evolución de anticuerpos *ex vivo* (Cumbers, S.J. y otros, *Nat Biotechnol* 20, 1129-1134 (2002); Seo, H. y col., *Nat Biotechnol* 23, 731 - 735 (2005)). Las células DT40 proliferan de forma robusta en cultivo, con un tiempo de duplicación de 8-10 horas (en comparación con 20-24 horas para las líneas de células B humanas), y admiten un direccionamiento génico homólogo muy eficaz (Buerstedde, J.M. y cols. *Embo J.* 9, 921- 927 (1990)). Las células DT40 comandan una enorme y potencial diversidad de secuencia de región V, dado que pueden acceder a dos vías fisiológicas distintas para la diversificación: la conversión génica y la hipermutación somática, que crean mutaciones con y sin plantilla, respectivamente (Maizels, N. *Annu Rev Genet* 39, 23-46 (2005)). Las inmunoglobulinas (Igs) de cadena pesada y ligera diversificadas se expresan en forma de una IgM que se exhibe en la superficie celular. La IgM superficial tiene una forma bivalente, estructuralmente similar a una molécula de IgG. Las células que muestran IgM con especificidad para un antígeno particular se pueden aislar mediante la unión de versiones inmovilizadas del antígeno solubles o expuestas a la membrana. Sin embargo, la utilidad de las células DT40 para la evolución de anticuerpos ha estado limitada en la práctica porque, como en otras líneas de células B transformadas, la diversificación ocurre a menos del 1 % de la tasa fisiológica.

50 En el sistema utilizado en este ejemplo, como se describe en los documentos de patente con los números WO2009029315 y US2010093033, las células DT40 se diseñaron para acelerar la tasa de diversificación génica de la Ig, sin sacrificar la capacidad de modificación genética adicional o el potencial de conversión génica e hipermutación somática para contribuir a la mutagénesis. Se hicieron dos modificaciones clave en la DT40 para aumentar la tasa de diversificación y, en consecuencia, la complejidad de las especificidades de unión en nuestra biblioteca de células. En primer lugar, la diversificación génica de la Ig se puso bajo el control de la potente red reguladora del operador/represor de lactosa del *E. coli*. Se insertaron unos multímeros que consistían en aproximadamente 100 repeticiones polimerizadas del potente operador de lactosa del *E. coli* (PolyLacO) corriente arriba de los genes reordenados y expresados de la Igl $\lambda$  y de la IgH, por direccionamiento génico homólogo. Los

55

factores reguladores fusionados a la proteína represora de lactosa (LacI) pueden unirse a los elementos reguladores de LacO para regular la diversificación, aprovechando la alta afinidad ( $k_D = 10^{-14}$  M) del represor de lactosa para el ADN del operador. Las células DT40 PolyLacO- $\lambda_R$ , en las que se integró el PolyLacO solo en Ig $\lambda$ , exhibieron un aumento de 5 veces en la tasa de diversificación génica de la Ig, con relación a las células parentales DT40 antes de cualquier ingeniería (Cummings, W.J. y cols. *PLoS Biol* 5, e246 (2007)). La diversificación se elevó aún más en las células diseñadas como portadoras de PolyLacO dirigido tanto a los genes de Ig $\lambda$  como de IgH (“DTLacO”). Se demostró que las células DTLacO tienen tasas de diversificación de 2,5 a 9,2 veces más elevadas con respecto a la característica del 2,8 % de la línea parental DT40 PolyLacO- $\lambda_R$  LacI-HP1. Por lo tanto, el direccionamiento de los elementos de PolyLacO a los genes de la cadena pesada y ligera aceleró la diversificación 21,7 veces con respecto a la línea celular parental DT40. La unión de factores reguladores a los loci de la Ig no solo altera la frecuencia de la mutagénesis, sino que también puede cambiar la vía de la mutagénesis, creando una mayor colección de cambios de secuencia únicos (Cummings y colaboradores, 2007; Cummings y colaboradores, 2008). En segundo lugar, se generó una colección diversa de puntos de partida de secuencia para la diversificación génica de la Ig con aceleración del factor de unión. Estos puntos de partida de secuencia diversa se añadieron a DTLacO dirigiendo regiones variables de cadena pesada de Ig reorganizadas, aisladas de un polluelo de dos meses, al locus de cadena pesada. La adición de estas regiones variables de cadena pesada creó un repertorio de  $10^7$  nuevos puntos de partida para la diversificación de anticuerpos. La construcción de estos nuevos puntos de partida en la línea celular DTLacO permite la identificación de clones que se unen a un objetivo particular, y luego la maduración de afinidad rápida por los factores de unión. Después de la maduración de afinidad, se prepara una IgG quimérica recombinante de longitud completa, clonando las secuencias variables maduras y reordenadas de cadena pesada y ligera (VH y VL; que consisten en regiones del marco del pollo y regiones determinantes de complementariedad o CDR) en vectores de expresión que contienen regiones constantes IgG1 y lambda humanas. Estos mA b recombinantes son adecuados para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, y sirven como punto de partida para la humanización.

Métodos:

Selección para la unión al antígeno de la MASP-1 y la MASP-3.

Las selecciones iniciales se realizaron uniendo poblaciones de DTLacO diversificadas por selección de genes a perlas en complejo con antígenos de la MASP-1 (ID. DE SEC. N.º 10) y de la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) humanas y selecciones posteriores por FACS, usando antígeno soluble marcado con fluorescencia (Cumbers, SJ y col., *Nat Biotechnol* 20, 1129-1134 (2002); Seo, H. y col., *Nat Biotechnol* 23, 731-735 (2005)). Debido a la secuencia de aminoácidos conservada en la cadena alfa que se comparte entre MASP-1 y MASP-3 (mostrada en la figura 5), y las distintas secuencias de la cadena beta (mostradas en la figura 6), se llevaron a cabo cribados en paralelo, por separado, para los enlazadores de la MASP-1 y de la MASP-3, a fin de identificar mA b específicos de la MASP-1, mA b específicos de la MASP-3 y también mA b capaces de unirse a MASP-1 y MASP-3 (doble especificidad). Se usaron dos formas de antígeno para seleccionar y cribar enlazadores. En primer lugar, MASP-1 o MASP-3 recombinante, de longitud completa o un fragmento, fusionadas a un dominio Fc se unieron a unas perlas de proteína G magnéticas Dynal o se usaron en selecciones basadas en FACS, usando un anti-humano marcado con PECy5, anti-humano, secundario IgG(Fc). Alternativamente, las versiones recombinantes de las proteínas de MASP-1 o MASP-3 se marcaron directamente con harinas Dylight y se usaron para las selecciones y el cribado.

Unión y afinidad.

Los anticuerpos recombinantes se generaron clonando regiones V amplificadas por PCR en un vector que admitía la expresión de IgG1 humana en células 293F (Yabuki y colaboradores, *PLoS ONE*, 7 (4): e36032 (2012)). La cinética de unión a la saturación se determinó mediante tinción de células DTLacO que expresaban anticuerpos que se unen a MASP-1 o MASP-3 con diversas concentraciones de antígeno soluble marcado con fluorescencia. Los ensayos funcionales para la actividad específica de la MASP-3, que incluye el depósito de C3b dependiente de la MASP-3 y la escisión del factor D dependiente de la MASP-3, se llevaron a cabo como se describe en los ejemplos 17 y 18, respectivamente. Se llevó a cabo un ensayo funcional para la actividad específica de la MASP-1, concretamente la inhibición del depósito de C3b dependiente de la MASP-1 como se describe a continuación.

Resultados:

Se generaron numerosos anticuerpos de unión a MASP-1 y MASP-3 usando los métodos descritos anteriormente. La unión, como se demuestra mediante análisis FACS, se describe para los clones representativos M3J5 y M3M1, que se aislaron en los cribados para los enlazantes de la MASP-3.

La figura 30A es un histograma de FACS de unión de antígeno/anticuerpo de la MASP-3 para el clon M3J5 de DTLacO. La figura 30B es un histograma de FACS de unión de antígeno/anticuerpo de la MASP-3 para el clon M3M1 de DTLacO. En las figuras 30A y 30B, las curvas rellenas en gris son control negativo con tinción de la IgG1, y las curvas negras gruesas representan la tinción de la MASP-3.

La figura 31 ilustra esquemáticamente una curva de unión de saturación del clon M3J5 (Clon 5) para el antígeno de la MASP-3. Tal como se muestra en la figura 31, la aparente afinidad de unión del anticuerpo M3J5 por la MASP-3 es de aproximadamente 31 nM.

5 El análisis de secuencia de los clones identificados se realizó utilizando métodos estándar. Todos los clones se compararon con las secuencias comunes (DT40) VH y VL y entre sí. Las secuencias para los dos clones anteriormente mencionados, M3J5 y M3M1 se proporcionan alineadas con dos clones representativos adicionales, D14 y 1E10, que se identificaron en los cribados para los fragmentos CCP1-CCP2-SP de la MASP-1 y de la MASP-3, respectivamente. El D14 y el 1E10 unen regiones comunes a MASP-1 y MASP-3.

La figura 32A es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VH de la DT40 del pollo.

La figura 32B es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VL de la DT40 del pollo.

10 La secuencia de aminoácidos VH y VL de cada clon se proporciona a continuación.

Secuencias de la región variable de cadena pesada (VH)

La figura 32A muestra una alineación de aminoácidos de las secuencias de la región variable de cadena pesada (VH) para el DTLacO parental (ID. DE SEC. N.º 24), los clones de unión de MASP-3 M3J5 (ID. DE SEC. N.º 25) y M3M1 (ID. DE SEC. N.º 26), y MASP-1/MASP-3, los clones de unión dual D14 (ID. DE SEC. N.º 30) y 1E10.

15 Las CDR de Kabat en las secuencias de VH presentadas a continuación se encuentran en las siguientes posiciones de aminoácidos: H1: aa 31-35; H2: aa 50-62; y H3: aa 95-102.

Las CDR de Chothia en las secuencias de VH a presentadas a continuación están ubicadas en las siguientes posiciones de aminoácidos: H1: aa 26-32; H2: aa 52-56; y H3: aa 95-101.

VH de DTLacO parental (ID. DE SEC. N.º 24)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDD  
 DSGSTRYAPAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYCTKCAYSNGCDY  
 20 EGGYIDAWGHGTEVIVSS

VH del clon M3J5: (ID. DE SEC. N.º 25)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFSSYAMGWMRQAPGKGLEVVAGIRS  
 DGSFTLYATAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYFCTRSGNVGDIDA  
 WGHGTEVIVSS

VH del clon M3M1: (ID. DE SEC. N.º 26)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDSSYQMNWIRQAPGKGLEFVAAINRF  
 GNSTGHGAAVKGRVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTATYYCAKGVYGYCGSY  
 SCCGVDTIDAWGHGTEVIVSS

25 VH del clon D14 VH: (ID. DE SEC. N.º 30)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAGIYK  
 SGAGTNYAPAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYCAKTTGSGCSSG  
 YRAEYIDAWGHGTEVIVSS

VH del clon 1E10: (ID. DE SEC. N.º 32)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMVWVRQAPGKGLEFVAGISRN  
 DGRYTEYGSAAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARDAGGSAYW  
 FDAGQIDAWGHGTEVIVSS

Secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL)

La figura 32B muestra una alineación de aminoácidos de las secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL) para el DTLacO parental (ID. DE SEC. N.º 27) y los clones de unión de MASP-3, M3J5 (ID. DE SEC. N.º 28) y M3M1 (ID. DE SEC. N.º 29), y los clones de unión dual de MASP-1/MASP-3, D14 (ID. DE SEC. N.º 31) y 1E10 (ID. DE SEC. N.º 33).

VL de DTLacO parental (ID. DE SEC. N.º 27):

ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKR  
PSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

VL del clon M3J5 (ID. DE SEC. N.º 28):

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGYSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNKR  
RPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

VL del clon M3M1 (ID. DE SEC. N.º 29):

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNKR  
PSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

VL del clon D14: (ID. DE SEC. N.º 31)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNKR  
PSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

VL del clon 1E10: (ID. DE SEC. N.º 33)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNKR  
PSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

Ensayo funcional de LEA-2 (dependiente de MASP-2)

La MASP-1 contribuye al LEA-2 por su capacidad para activar a la MASP-2 (véase la figura 1). El ensayo Wieslab® Complement System Screen MBL (Euro Diagnostica, Malmö, Suecia) mide el depósito de C5b-C9 en condiciones que aíslan la activación dependiente de LEA-2 (es decir, la actividad de la vía de la lectina tradicional). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el clon 1E10 representativo, probado a una concentración final de 400 nM.

La figura 33 es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibitora del mAb 1E10, en comparación con el suero positivo proporcionado con el kit de ensayo, así como un anticuerpo de control de isotipo. Tal como se muestra en la figura 33, el mAb 1E10 demuestra la inhibición parcial de la activación dependiente de LEA-2 (a través de la inhibición de la activación de la MASP-2 dependiente de la MASP-1), mientras que el anticuerpo de control de isotipo, no. Se debe lograr una inhibición más fuerte mediante la maduración por afinidad continua de este anticuerpo para la unión a MASP-1 usando los factores anclados o de unión en el sistema DTLacO.

Los ensayos de función del LEA-1 (dependiente de la MASP-3) para los mAb representativos se describen a continuación, en los ejemplos 17 y 18.

Resumen de resultados:

Los resultados anteriores mostraron que la plataforma de DTLacO permitía el descubrimiento *ex vivo* rápido de anticuerpos monoclonales de la MASP-1 y de la MASP-3, con propiedades inhibitoras en el LEA-1 (como se muestra a continuación en los ejemplos 17 y 18) y en LEA-2 (como se muestra en este ejemplo).

Ejemplo 16

Este ejemplo describe la generación de inhibidores polipeptídicos *de la MASP-1 y de la MASP-2*.

Fundamentos:

La generación de inhibidores específicos de la MASP-1 y de la MASP-2, denominados SGMI-1 y SGMI-2, respectivamente, se describe en Heja y col., *J. Biol Chem* 287: 20290 (2012) y Heja y colaboradores, *PNAS* 109.: 10498 (2012). SGMI-1 y SGMI-2, cada uno de ellos, son péptidos de 36 aminoácidos que se seleccionaron de una biblioteca de fagos de variantes del inhibidor 2 de la proteasa de *Schistoserca gregaria*, donde seis de las ocho posiciones del bucle de unión de la proteasa estaban completamente aleatorizadas. La posterior evolución *in vitro* produjo inhibidores mono-específicos, con valores de  $K_i$  de nM de un solo dígito (Heja y col., *J Biol. Chem.* 287: 20290, 2012). Los estudios estructurales revelaron que el bucle de unión de la proteasa optimizado forma el sitio de unión primario que define la especificidad de los dos inhibidores. Las secuencias de aminoácidos de las regiones de unión secundarias e internas extendidas son comunes a los dos inhibidores y contribuyen a la interfaz de contacto (Heja y colaboradores, 2012. *J Biol. Chem.* 287: 20290). Mecánicamente, tanto SGMI-1 como SGMI-2 bloquean la vía de la lectina de la activación del complemento sin afectar a las vías clásica o alternativa (Heja y colaboradores, 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 10498). Las secuencias de aminoácidos de los inhibidores SGMI-1 y SGMI-2 se exponen a continuación:

15 Longitud completa de SGMI-1: LEVTCCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAFCTRKL<sub>1</sub>CYQ (ID. DE SEC. N.º 34)

Longitud completa de SGMI-2: LEVTCCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKL<sub>2</sub>WCNQ (ID. DE SEC. N.º 35)

SGMI-1 y SGMI-2 son inhibidores altamente específicos de la MASP-1 y de la MASP-2, respectivamente. Sin embargo, como péptidos, tienen un potencial limitado para su uso en estudios biológicos. Para abordar estas limitaciones, injertamos estas secuencias de aminoácidos de péptidos bioactivos en el extremo amino de la región Fe de la IgG1 humana para crear una proteína de fusión Fc.

Métodos:

Para expresar las proteínas de fusión Fc de SGMI-IgG1, se sintetizaron los polinucleótidos que codifican los péptidos de SGMI-1 (ID. DE SEC. N.º 34) y SGMI-2 (ID. DE SEC. N.º 35) (ADN 2.0) y se insertaron en el vector de expresión pFUSE- hlgG1-Fc2 (InvivoGen) entre las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de señal de IL-2 y la región Fc de la IgG1 humana (ID. DE SEC. N.º 36). Se incluyó un enlazador polipeptídico flexible (por ejemplo, ID. DE SEC. N.º 37 o ID. DE SEC. N.º 38) entre el péptido de SGMI y la región Fc de la IgG1.

Secuencias del enlazador polipeptídico flexible:

GTGGGSGSSRS (ID. DE SEC. N.º 37)

30 GTGGGSGSSS (ID. DE SEC. N.º 38)

Los constructos resultantes se describen de la siguiente manera:

Un polinucleótido que codifica la fusión polipeptídica que comprende la secuencia de señal de IL-2 humana, SGMI-1, un enlazador y la IgG1-Fc humana (pFUSE-SGMI-1Fc), se presenta como ID. DE SEC. N.º 39, que codifica el polipéptido maduro fusión que comprende SGMI-1 (subrayado), la región enlazadora (en cursiva) y la IgG1-Fc humana (que en conjunto se denomina "SGMI-1Fc"), que se presenta como ID. DE SEC. N.º 40.

ID. DE SEC. N.º 40

LEVTCCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAFCTRKL<sub>1</sub>CYQ*GTGGGSGSSRS*SDK  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT  
 QKSLSLSPGK

Un polinucleótido que codifica la fusión polipeptídica que comprende la secuencia de señal de IL-2 humana, SGMI-2, un enlazador y la IgG1-Fc humana (pFUSE-SGMI-2Fc), se presenta como ID. DE SEC. N.º 41, que codifica la fusión del polipéptido maduro que comprende SGMI-2 (subrayado), la región enlazadora (en cursiva) y la IgG1-Fc humana (que en conjunto se denomina "SGMI-2Fc"), que se presenta como ID. DE SEC. N.º 42:

ID. DE SEC. N.º 42

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSRSDK  
 THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT  
 QKSLSLSPGK

Producción de proteínas recombinantes:

5 Unas células Freestyle 293-F o Expi293F (Invitrogen) se transfectaron transitoriamente de acuerdo con el protocolo del proveedor, con uno de los dos plásmidos de expresión (pFUSE SGMI-1Fc (ID. DE SEC. N.º 39) y pFUSE-SGMI-2Fc (ID. DE SEC. N.º 41)). Después de cuatro días de incubación a 37 °C, se recogieron los medios de cultivo. Las proteínas de fusión Fc se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Ensayos que miden la activación de la vía de la lectina.

10 Las proteínas de fusión SGMI-1Fc y SGMI-2Fc se sometieron a prueba para determinar la capacidad de inhibir el depósito de C3b, a partir de suero al 1 % en una placa de 96 pocillos revestida de manano, que es una medida de la actividad de la vía de la lectina. Las SGMI-1Fc y SGMI-2Fc se preincubaron con suero humano normal al 1 % durante una hora en hielo antes de la adición a pocillos recubiertos con manano (2 µg/pocillo). El depósito de C3b se midió por ELISA como se describe en Schwaeble y colaboradores *PNAS* 108: 7523, 2011.

15 La figura 34 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b para el 1 % de suero humano normal más control de isotipo, SGMI-1Fc o SGMI-2Fc en un intervalo de concentración de 0,15 a 1000 nM. Tal como se muestra en la figura 34, tanto SGMI-1Fc como SGMI-2Fc inhibieron el depósito de C3b del suero normal en pocillos ELISA revestidos de manano, con valores IC<sub>50</sub> de aproximadamente 27 nM y 300 nM, respectivamente.

Estos resultados demuestran que las funciones inhibitoras de la MASP-1 y de la MASP-2 de los péptidos SGMI se retienen en las proteínas de fusión SGMI-1Fc y SGMI-2Fc.

20 Ejemplo 17

Análisis de la vía del complemento en el suero de un paciente con 3MC con *S. aureus*

Antecedentes/justificación:

25 Se determinó que la MASP-3 no se activa a través de la exposición a manano, zimosano A o N-acetil cisteína en fase no inmovilizada en presencia o ausencia de suero humano normal. Sin embargo, se determinó que la MASP-3 recombinante y nativa se activa en la superficie del *S. aureus* inactivado por calor, en presencia y ausencia de suero humano normal (NHS) o suero humano inactivado por calor (HIS) (datos no mostrados). También se determinó que el depósito de C3b ocurre en la superficie de *S. aureus* en presencia de suero humano normal, y que el depósito se puede controlar usando un citómetro de flujo. Por lo tanto, la respuesta de la vía alternativa (AP) al *S. aureus* se midió según se describe en este ejemplo, como un medio para evaluar la contribución de la MASP-3 al LEA-1.

30 Métodos:

35 MASP-3 recombinante: unas secuencias de polinucleótidos que codifican MASP-3 humana recombinante de longitud completa, una versión activa de serina proteasa (SP) truncada de la MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) y una forma de la MASP-3 inactivada con SP (S679A) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pTriEx7 (Invivogen). Los constructos de expresión resultantes codifican la MASP-3 de longitud completa o el fragmento CCP1-CCP2-SP con una Streptag amino-terminal y una etiqueta His<sub>6</sub> carboxi-terminal. Los constructos de expresión se transfectaron en células Freestyle 293-F o Expi293F (Invitrogen), de acuerdo con los protocolos proporcionados por el fabricante. Después de tres a cuatro días de cultivo en CO<sub>2</sub> al 5 % y a 37 °C, las proteínas recombinantes se purificaron utilizando cromatografía de afinidad con estreptactina.

40 MASP-1 recombinante: las formas CCP1-CCP2-SP truncadas o de longitud completa de la MASP-1 recombinante, con o sin el R504Q estabilizante (Dobo y colaboradores, *J. Immunol* 183: 1207, 2009) o mutaciones que inactivan SP (S646A) y que llevan una etiqueta Steptag amino-terminal y una etiqueta His<sub>6</sub> carboxi-terminal se generaron como se describe para MASP-3 recombinante anterior.

1. Depósito de C3b y escisión del factor B en *S. aureus* en suero de un paciente con 3MC (humano)

Se llevó a cabo un experimento inicial para demostrar que el ensayo de citometría de flujo es capaz de detectar la presencia o ausencia de depósito de C3b impulsado por la AP (AP-C3b) de la siguiente manera. El cinco por ciento de los siguientes sueros: suero humano normal, suero humano con factor B agotado (suero factor B-), suero humano con factor D agotado y suero humano con properdina agotada (obtenidos de Complement Technology, Tyler, Texas, EE. UU.) se mezclaron con el anticuerpo de prueba en tampón  $Mg^{++}/EGTA$  o EDTA a 4 °C, durante la noche. Se añadió *S. aureus* extinguido por calor ( $10^8$ /reacción) a cada mezcla hasta un volumen total de 100  $\mu$ l y se hizo girar a 37 °C durante 40 minutos. Las bacterias se lavaron en tampón de lavado, el pellet bacteriano se volvió a suspender en tampón de lavado y se analizó una alícuota de 80  $\mu$ l de cada muestra para determinar el depósito de C3b en la superficie bacteriana, que se detectó con C3c antihumano (Dako, Reino Unido) usando citometría de flujo.

Los resultados de la detección por citometría de flujo de C3b se muestran en la Figura 35A. Tal como se muestra en la figura 35A, en el panel 1, suero humano normal en presencia de EDTA que, según se sabe, inactiva el AP, no se observó depósito de C3b (control negativo). En el suero humano normal tratado con  $Mg^{++}/EGTA$ , solo pueden funcionar las vías del complemento independientes de la lectina. En el panel 2, se usa el tampón  $Mg^{++}/EGTA$ , por lo tanto, la AP está activa y se observa un depósito de C3b controlado por AP (control positivo). Como se muestra en el panel 3, en el 4 y en el 5, en el suero con agotamiento de factor B, factor D y properdina, respectivamente, no se observa un depósito de C3b impulsado por la vía alternativa, como se esperaba. Estos resultados demuestran que el ensayo puede detectar el depósito de C3b dependiente de la AP.

Se realizó un depósito de C3b en el ensayo con *S. aureus*, tal como se describió anteriormente con el fin de evaluar la capacidad de la MASP-3 recombinante para reconstituir la AP (LEA-1) en suero de 3MC humano, que es con deficiencia en MASP-3 (Rooryck C, y colaboradores, Nat Genet. 43 (3): 197-203 (2011)). Se probaron las siguientes combinaciones de reactivos.

1. 5 % de suero humano normal + EDTA

2. 5 % de suero humano normal +  $Mg/EGTA$

3. 5 % de suero humano 3MC (MASP-3<sup>-/-</sup>) +  $Mg^{++}/EGTA$

4. 5 % de suero humano de 3MC (MASP-3<sup>-/-</sup>) +  $Mg^{++}/EGTA$  más rMASP-3 activo de longitud completa

5. 5 % de suero humano 3MC (MASP-3<sup>-/-</sup>) +  $Mg^{++}/EGTA$  más rMASP-3 truncado activo (CCP1/CCP2/SP)

6. 5 % de suero de un paciente con 3MC humano (MASP-3<sup>-/-</sup>) +  $Mg^{++}/EGTA$  más rMASP-3 inactivo (S679A)

7. 5 % de suero de un paciente con 3MC humano (MASP-3<sup>-/-</sup>) +  $Mg^{++}/EGTA$  más rMASP-1 activo de longitud completa

Las diversas mezclas de 5 % de suero y proteínas recombinantes (5  $\mu$ g de cada una) que se indicaron con anterioridad se incubaron en las condiciones de tampón especificadas (tampón  $Mg^{++}/EGTA$  o EDTA) a 4 °C, durante la noche. Después de la incubación durante la noche, se añadieron  $10^8$  *S. aureus* muertos por calor a cada mezcla, en un volumen total de 100  $\mu$ l y se hicieron girar a 37 °C durante 40 minutos. Las bacterias se lavaron y se volvieron a suspender en tampón de lavado, y una alícuota de 80  $\mu$ l de cada muestra se analizó para determinar el depósito de C3b mediante FACS. La alícuota de 20  $\mu$ l restante de cada muestra se usó para medir la escisión del factor B mediante transferencia *Western* usando anticuerpo anti-factor B como se describe a continuación.

Los resultados de la detección de C3b por citometría de flujo se muestran en la Figura 35B. Los números del panel corresponden a los números designados para cada una de las combinaciones de reactivos descritas anteriormente. El control negativo (panel 1) y el control positivo (panel 2) muestran la ausencia y la presencia de depósito de C3b, como se esperaba. El panel 3 muestra que el depósito de C3b impulsado por la AP está ausente en el suero de 3MC. Los paneles 4 y 5 muestran que el rMASP-3 activo de longitud completa (panel 4) y el rMASP-3 activo (CCP1-CCP2-SP) (panel 5) restauran el depósito de C3b controlado por la AP en el suero de 3MC. El panel 6 muestra que el rMASP-3 inactivo (S679A) no restaura el depósito de C3b impulsado por la AP en el suero de 3MC. El panel 7 muestra que el rMASP-1 no restaura el depósito de C3b impulsado por la AP en el suero de un paciente con 3MC.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que se requiere de la MASP-3 para el depósito de C3b impulsado por la AP sobre *S. aureus* en el suero humano.

## 2. Activación del factor B dependiente de la MASP-3

Para analizar la activación del factor B dependiente de la MASP-3, se ensayaron las diversas mezclas de suero al 5 % (suero humano normal o suero de un paciente con 3MC) y las proteínas recombinantes indicadas más arriba, tal como se describió anteriormente. De cada mezcla de reacción, se extrajeron 20  $\mu$ l y se añadieron al tampón de carga de la muestra de proteína. Las muestras se calentaron a 70 °C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de SDS-PAGE. El análisis de transferencia *Western* se realizó usando un anticuerpo policlonal de Factor B (R&D Systems). La activación del factor B fue evidente por la formación de dos productos de escisión de menor peso

molecular (Bb y Ba) derivados de la proteína del pro-factor B de mayor peso molecular.

La figura 36 muestra los resultados de un análisis de transferencia *Western* para determinar la escisión del factor B en respuesta al *S. aureus* en suero de un paciente con 3MC, en presencia o ausencia de rMASP-3. Como se muestra en la banda 1, el suero humano normal en presencia de EDTA (control negativo) muestra muy poca escisión del Factor B en relación con el suero humano normal en presencia de  $Mg^{++}/EGTA$ , que se muestra en la banda 2 (control positivo). Como se indica en la banda 3, el suero de un paciente con 3MC denota muy poca escisión del factor B en presencia de  $Mg^{++}/EGTA$ . Sin embargo, como se muestra en la banda 4, la escisión del factor B se restablece mediante la adición y preincubación de la proteína de la MASP-3 recombinante de longitud completa (5  $\mu$ g) al suero de un paciente con 3MC.

### 10 3. Ensayo para determinar el efecto de rMASP-3 sobre el pro-factor-D, en la escisión del factor B/C3 (H<sub>2</sub>O)

El siguiente ensayo se llevó a cabo para determinar el requisito mínimo para la activación/escisión del factor B dependiente de la MASP-3.

15 C3 (H<sub>2</sub>O) (200 ng), el factor B purificado del plasma (20  $\mu$ g), el pro-factor D recombinante (200 ng) y MASP-3 humana recombinante (200 ng) se mezclaron entre sí, en varias combinaciones (tal como se muestra en la figura 37), en un volumen total de 100  $\mu$ l en BBS/ $Ca^{++}/Mg^{++}$  y se incubaron a 30 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 25  $\mu$ l de colorante de carga de SDS que contenía 5 % de 2-mercaptoetanol. Después de hervir a 95 °C durante 10 minutos bajo agitación (300 rpm), la mezcla se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos y se cargaron 20  $\mu$ l del sobrenadante y se separaron en un gel de SDS al 10 %. El gel se tiñó con azul brillante Coomassie.

### 20 Resultados:

La figura 37 muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie en el que se analiza la escisión del factor B. Como se muestra en la banda 1, la escisión del factor B es la más óptima en presencia de C3, MASP-3 y pro-factor D. Como se muestra en la línea 2, C3 es absolutamente necesario; sin embargo, como se muestra en las bandas 4 y 5, la MASP-3 o el pro-factor D son capaces de mediar la escisión del factor B, siempre que C3 esté presente.

### 25 4. Análisis de la capacidad de los mAb de la MASP-3 para inhibir el depósito de C3b impulsado por la AP y dependiente de la MASP-3.

Como se describe en este ejemplo, se demostró que se requiere de la MASP-3 para el depósito de C3b impulsado por la AP sobre el *S. aureus* en el suero humano. Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente ensayo para determinar si un mAb de la MASP-3 representativo, identificado como se describe en el ejemplo 15, podría inhibir la actividad de la MASP-3. La proteína recombinante, activa del fragmento de la MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) (250 ng) se preincubó con un mAb de control isotípico, el mAb1A5 (control obtenido de la plataforma DTLacO que no se une a MASP-3 o MASP-1), o mAbD14 (que se une a MASP-3) en tres concentraciones diferentes (0,5, 2 y 4  $\mu$ M), durante 1 hora en hielo. La mezcla de enzima-mAb se expuso a 5 % de suero de un paciente con 3MC (con deficiencia de MASP-3) y  $5 \times 10^7$  de *S. aureus* exterminado por calor, en un volumen de reacción final de 50  $\mu$ l. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y luego se tiñeron para la detección del depósito de C3b. Las células bacterianas teñidas se analizaron mediante un citómetro de flujo.

La figura 38 ilustra esquemáticamente las intensidades fluorescentes medias (MFI, *mean fluorescent intensities*) de la tinción de C3b obtenida a partir de los tres anticuerpos representados gráficamente en función de la concentración de mAb en el suero de un paciente con 3MC, con la presencia de rMASP-3. Tal como se muestra en la figura 38, el mAbD14 demuestra la inhibición del depósito de C3b de una manera dependiente de la concentración. Por el contrario, ninguno de los mAb de control inhibió el depósito de C3b. Estos resultados demuestran que el mAbD14 es capaz de inhibir el depósito de C3b dependiente de la MASP-3. Se espera que haya una mejora en la actividad inhibidora para el mAbD 14, después de la maduración por afinidad continua de este anticuerpo para la unión de la MASP-3, usando los factores de unión en el sistema DTLacO.

### 45 Resumen de los resultados:

En resumen, los resultados en este ejemplo demuestran un defecto manifiesto de la AP en el suero con deficiencia de MASP-3. Por lo tanto, se ha demostrado que la MASP-3 hace una contribución crítica a la AP, mediante el uso de la activación del factor B y del depósito de C3b como puntos finales funcionales. Además, la adición de la MASP-3 recombinante funcional, que incluye la porción C-terminal catalíticamente activa de la MASP-3, corrige el defecto en la activación del factor B y el depósito de C3b en el suero del paciente con 3MC. Por el contrario, como se demuestra también en este ejemplo, la adición de un anticuerpo de la MASP-3 (por ejemplo, mAbD14) en el suero de un paciente con 3MC con rMASP-3 inhibe el depósito de C3b impulsado por la AP. Un papel directo de la MASP-3 en la activación del factor B y, por lo tanto, de la AP, se demuestra mediante la observación de que el MASP-3 recombinante, junto con C3, es suficiente para activar el factor B recombinante.

### 55 Ejemplo 18

Este ejemplo demuestra que la MASP-1 y MASP-3 activan el factor D.

Métodos:

5 Se sometieron a prueba la MASP-1 y la MASP-3 recombinantes para determinar su capacidad para escindir dos versiones recombinantes diferentes del pro-factor D. La primera versión (pro-factor D-His) carece de una etiqueta N-terminal, pero tiene una etiqueta C-terminal His<sub>6</sub>. Por lo tanto, esta versión del pro-factor D contiene el pro-péptido de 5 aminoácidos que se elimina por escisión durante la activación. La segunda versión (ST-pro-factor D-His) tiene una secuencia Strep-TagII en el término N, aumentando así el fragmento N-terminal escindido a 15 aminoácidos. El ST-pro-factor D también contiene una etiqueta His<sub>6</sub> en el término C. El aumento de la longitud del propéptido del factor ST-pro D-His mejora la resolución entre las formas escindidas y las no escindidas por SDS PAGE, en comparación con la resolución posible con la forma pro-factor D-HIS.

10 Se añadieron proteínas de MASP-1 o MASP-3 recombinantes (2 µg) a los sustratos del pro-factor D-His o del ST-pro-factor D-His (100 ng) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las reacciones se sometieron a electroforesis en un gel Bis-Tris al 12 % para resolver el pro-factor D y el producto de escisión del factor D activo. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante transferencia *Western*, por detección con un anticuerpo biotinilado del factor D (R&D Systems).

Resultados:

20 La figura 39 muestra el análisis de transferencia *Western* de la escisión del sustrato del pro-factor D. Tal como se muestra en la figura 39, solo la MASP-3 de longitud completa (banda 2) y el fragmento de la MASP-1, CCP1-CCP2-SP) (banda 5) escindieron ST-pro-factor D-His<sub>6</sub>. Ni la MASP-3 catalíticamente inactiva de longitud completa (S679A; banda 3) ni la MASP-1 (S646A; banda 3) lograron escindir alguno de los sustratos. Se obtuvieron resultados idénticos con el polipéptido pro-factor D-His<sub>6</sub> (no mostrado). La comparación de un excedente molar de la MASP-1 (CCP1-CCP2-SP) con respecto a la MASP-3 sugiere que la MASP-3 es un catalizador más eficaz de la escisión del pro-factor D que la MASP-1, al menos en las condiciones descritas en el presente documento.

25 Conclusiones: tanto la MASP-1 como la MASP-3 son capaces de escindir y activar el factor D. Esta actividad conecta directamente al LEA-1 con la activación de la AP. Más específicamente, la activación del factor D por la MASP-1 o MASP-3 conducirá a la activación del factor B, al depósito de C3b y a las posibles opsonización y/o lisis.

1. Ensayo para la inhibición de la escisión dependiente de la MASP-3 del pro-factor D con anticuerpos de la MASP-3

30 Se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto inhibitor de los mAb representativos de la MASP-3 y MASP-1, identificados como se describe en el ejemplo 15, en la escisión dependiente de la MASP-3 del factor D de la siguiente manera. La proteína de la MASP-3 recombinante activa (80 ng) fue preincubada con 1 µg de mAb representativo D14, M3M1, y un anticuerpo de control (que se une específicamente a la MASP-1, pero no a la MASP-3), a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió pro-factor D con una etiqueta Strep N-terminal (ST-pro-factor D-His, 70 ng), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 75 minutos. Las reacciones se sometieron entonces a electroforesis, se transfirieron y se tiñeron con anti-factor D, como se describió anteriormente.

35 La figura 40 es una transferencia *Western* que muestra la actividad inhibitora parcial de los mAb D14 y M3M1, en comparación con una reacción de control que contiene solo MASP-3 y ST-pro factor D-His (sin mAb; banda 1), así como una reacción de control que contiene un mAb obtenido de la biblioteca DTLacO que se une a MASP-1, pero no a la MASP-3 (banda 4). Tal como se muestra en la figura 40, en ausencia de un anticuerpo inhibitor, la MASP-3 escinde aproximadamente el 50 % del pro-factor D, en el factor D (banda 1). El control del anticuerpo específico MASP-1 (banda 4) no cambia la relación de pro-factor D a factor D. Por el contrario, como se muestra en las bandas 2 y 3, tanto el mAb D14 como el mAb M3M1 inhiben la escisión dependiente de la MASP-3 del pro-factor D al factor D, lo que resulta en una reducción en el factor D generado.

45 Conclusiones: estos resultados demuestran que los mAb D14 y M3M1 de la MASP-3 son capaces de inhibir la escisión del factor D dependiente de la MASP-3. Se espera que mejore la actividad inhibitora para el mAbD14 y el mAb M3M1 después de la maduración por afinidad continua de estos anticuerpos para la unión de la MASP-3 usando los factores anclados en el sistema DTLacO.

Ejemplo 19

Este ejemplo demuestra que la deficiencia de la MASP-3 evita la lisis mediada por complemento de los eritrocitos de conejo WT recubiertos con manano.

50 Antecedentes/justificación:

Como se describe en los ejemplos 5 y 6 del presente documento, el efecto del suero con deficiencia en MASP-2 y MASP-3 en la lisis de glóbulos rojos a partir de unas muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón de la HPN demostró la eficacia de la inhibición de la MASP-2 y/o de la inhibición de la MASP-3 para tratar sujetos que

padecen HPN, y también apoyó el uso de inhibidores de la MASP-2 y/o inhibidores de la MASP-3 (incluso inhibidores duales o bi-específicos de la MASP-2/MASP-3), para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por fragmentos C3 en sujetos con HPN sometidos a una terapia con un inhibidor de C5, como el eculizumab.

- 5 Tal como se describe en este ejemplo, los experimentos de depósito de C3b y hemólisis se llevaron a cabo en suero con deficiencia en MASP-3 tomados de otros pacientes con 3MC, confirmando los resultados obtenidos en los ejemplos 5 y 6. Por otro lado, se realizaron experimentos que demostraron que la adición de rMASP-3 al suero de pacientes con 3MC pudo reconstituir el depósito de C3b y la actividad hemolítica.

Métodos:

- 10 El suero con deficiencia en MASP-3 se obtuvo de tres pacientes diferentes que tenían 3MC, de la siguiente manera:

Paciente 1 con 3MC: contiene un alelo que tiene una mutación que hace disfuncional el exón que codifica el dominio serinproteasa MASP-3, suministrado junto con la madre y el padre del paciente con 3MC (ambos heterocigotos para el alelo portador de una mutación que hace que el exón que codifica al dominio de serina proteasa de la MASP-3 sea disfuncional).

- 15 Paciente 2 con 3MC: tiene la mutación C1489T (H497Y) en el exón 12 de la MASP-1, el exón que codifica el dominio de serina proteasa de la MASP-3, lo que da como resultado que la MASP-3 se torne no funcional, pero que las proteínas de la MASP-1 sean funcionales.

Paciente 3 con 3MC: tiene un defecto confirmado en el gen MASP-1, que da como resultado que las proteínas de la MASP-3 sean no funcionales, pero que las proteínas de la MASP-1 sean funcionales.

- 20 Experimento n.º 1: ensayo del depósito de C3b

Se llevó a cabo un ensayo de AP en condiciones específicas de la AP tradicional (BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA, sin Ca<sup>++</sup>, en donde BBS = solución salina tamponada de barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann y colaboradores, *Eur. J. Immunol* 11: 291-295 (1981)), sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, a concentraciones en suero que variaban de 0,5 a 25 %, y se midió el depósito de C3b a lo largo del tiempo.

- 25 Resultados:

La figura 41 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como una función de la concentración sérica en las muestras de suero obtenidas de sujetos con deficiencia en MASP-3 (3MC), con deficiencia en C4 y con deficiencia en MBL. Tal como se muestra en la figura 41 y como se resume a continuación en la tabla 18, los sueros de pacientes con deficiencias en MASP-3 provenientes del paciente 2 y del paciente 3 tienen una actividad residual de la AP a altas concentraciones (concentraciones séricas de 25 %, 12,5 %, 6,25 %), aunque una AP<sub>50</sub> significativamente mayor (es decir, fue necesario 8,2 % y 12,3 % de suero para alcanzar el 50 % del depósito máximo de C3).

- 30

La figura 42 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, en condiciones de AP "tradicionales" (es decir, BBS/EGTA/Mg<sup>++</sup> sin Ca<sup>++</sup>) en función del tiempo, en muestras de suero humano al 10 % obtenidas de sujetos humanos que tenían deficiencia en MASP-3, deficiencia en C4 y deficiencia en MBL.

- 35

La tabla 18 presentada a continuación resume los resultados de la AP<sub>50</sub> que se muestran en la figura 41 y las semivididas para el depósito de C3b que se representan en la figura 42.

Tabla 18: resumen de los resultados representados en las figuras 41 y 42

Tipo de suero	AP <sub>50</sub> (%)	T <sub>1/2</sub> (min)
Normal	4,5	26,3
Con deficiencia en MBL (MBL-/-)	5,7	27,5
Con deficiencia en C4 (C4-/-)	5,1	28,6
3MC (paciente 3)	8,2	58,2
3MC (paciente 2)	12,3	72,4

- 40 Nota: en el tampón BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA, los efectos mediados por la vía de la lectina son deficientes debido a la ausencia de Ca<sup>++</sup> en este tampón.

Experimento n.º 2: ensayo de hemólisis que pone a prueba eritrocitos de conejo recubiertos con manano para la lisis, en presencia de suero humano normal o 3MC (en ausencia de  $Ca^{++}$ )

Métodos:

Preparación de RBC de conejo en ausencia de  $Ca^{++}$  (es decir, mediante el uso de EGTA)

5 La sangre entera de conejo (2 ml) se dividió en dos tubos eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó durante 3 minutos, a 8000 rpm (aproximadamente 5,9 rcf) en una centrifuga eppendorf refrigerada a 4 °C. El pelet de RBC se lavó tres veces después de resuspenderse en BBS/ $Mg^{++}$ / $Ca^{++}$  enfriado con hielo (ácido barbitúrico 4,4 mM, barbitona de sodio 1,8 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4,  $Mg^{++}$  5 mM,  $Ca^{++}$  5 mM). Después del tercer lavado, el pelet se volvió a suspender en 4 ml de BBS/ $Mg^{++}$ / $Ca^{++}$ . Los eritrocitos se sedimentaron y los glóbulos rojos se lavaron con BBS/gelatina al 0,1 %/ $Mg^{++}$ / $Ca^{++}$  como se describió anteriormente. La suspensión de glóbulos rojos se almacenó en BBS/gelatina al 0,1 % / $Mg^{++}$ / $Ca^{++}$ , a 4 °C. Luego, 100 µl de glóbulos rojos suspendidos se diluyeron con 1,4 ml de agua y se centrifugaron a 8000 rpm (aproximadamente 5,9 rcf) durante 3 minutos y la OD del sobrenadante se ajustó a 0,7 a 541 nm (una OD de 0,7 a 541 nm corresponde aproximadamente a  $10^9$  eritrocitos/ml). Después de eso, 1 ml de glóbulos rojos resuspendidos a un OD de 0,7 se añadieron a 9 ml de BBS/ $Mg^{++}$ /EGTA, con el fin de alcanzar una concentración de  $10^8$  eritrocitos/ml. Las diluciones de los sueros o del plasma de prueba se prepararon en BBS,  $Mg^{++}$ , EGTA enfriado con hielo, y se pipetearon 100 µl de cada dilución de suero o plasma en el pocillo correspondiente de la placa de fondo redondo. Se añadieron 100 µl de RBC diluidos adecuadamente ( $10^8$  eritrocitos/ml) a cada pocillo. Se usó nanoagua para producir el control positivo (100 % de lisis), mientras que una dilución con BBS/ $Mg^{++}$ /EGTA sin suero o plasma se usó como control negativo. La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C. La placa de fondo redonda se centrifugó a 3750 rpm durante 5 minutos. Luego, se transfirieron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano y se leyó la OD a 415 - 490 nm.

Resultados:

25 La figura 43 ilustra esquemáticamente el porcentaje de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina de los eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante, según se determinó por fotometría) de los eritrocitos de conejo recubiertos con manano, en un intervalo de concentraciones séricas en el suero proveniente de sujetos normales y de dos pacientes con 3MC (paciente 2 y paciente 3), medido en ausencia de  $Ca^{++}$ . Tal como se muestra en la figura 43, se demuestra que la deficiencia de la MASP-3 reduce el porcentaje de lisis mediada por el complemento de los eritrocitos recubiertos con manano, en comparación con el suero humano normal. Las diferencias entre las dos curvas del suero humano normal y las dos curvas de los pacientes con 3MC son significativas ( $p = 0,013$ , prueba de Friedman).

La tabla 19 presentada a continuación resume los resultados de la  $AP_{50}$ , tal como se muestra en la figura 43.

Tabla 19: resumen de los resultados que se muestran en la figura 43

Tipo de suero	$AP_{50}$ (%)
Suero humano normal n.º 1	7,1
Suero humano normal n.º 2	8,6
Paciente con 3MC n.º 2	11,9
Paciente con 3MC n.º 3	14,3

35 Se observa que cuando se combinaron las muestras de suero detalladas en la tabla 19, el valor de  $AP_{50}$  para el suero humano normal fue de 7,9, y el valor de  $AP_{50}$  para el suero de un paciente con 3MC fue de 12,8 ( $p = 0,031$ , prueba de rangos con signo de Wilcoxon).

Experimento n.º 3: la reconstitución del suero de un paciente con 3MC humano por la MASP-3 recombinante restaura el depósito de C3b impulsado por la AP sobre placas revestidas de zimosano

40 Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo de AP en condiciones específicas de AP tradicional (BBS/ $Mg^{++}$ /EGTA, sin  $Ca^{++}$ , en donde BBS = solución salina tamponada de barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann y colaboradores, Eur. J. Immunol 11: 291-295 (1981)), sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, en las siguientes muestras de suero: (1) suero humano al 5 % del paciente con 3MC n.º 2, donde se agregó rMASP-3 activo de longitud completa en un intervalo de 0 a 20 µg/ml; (2) suero humano al 10 % del paciente n.º 2 con 3MC,

donde se agregó rMASP-3 activo de longitud completa, en un intervalo de 0 a 20 µg/ml y (3) suero humano al 5 % del paciente n° 2 con 3MC donde se añadió rMASP-3A inactivo (S679A) en un intervalo de 0 a 20 µg/ml.

Resultados:

5 La figura 44 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por la AP sobre unas placas de microtitulación recubiertas con zimosano, como función de la concentración de la proteína de rMASP-3 añadida a las muestras de suero obtenidas del paciente humano n° 2 con 3MC (deficiencia de la MASP-3). Tal como se muestra en la figura 44, la proteína de la MASP-3 recombinante activa reconstituye el depósito de C3b impulsado por la AP sobre placas recubiertas con zimosano, de una manera dependiente de la concentración. Como se muestra por otra parte en la figura 44, no se observó depósito de C3b en el suero del paciente con 3MC que contenía rMASP-3 inactivo (S679A).

10 Experimento n. ° 4: la reconstitución del suero del paciente humano con 3MC por la MASP-3 recombinante restaura la actividad hemolítica en el suero del paciente con 3MC

Métodos:

15 Se llevó a cabo un ensayo hemolítico utilizando RBC de conejo, aplicando los métodos descritos anteriormente en el experimento n° 2 con los siguientes sueros de prueba, en un intervalo de 0 a 12 % de suero: (1) suero humano normal; (2) suero de un paciente con 3MC; (3) suero de un paciente con 3MC más rMASP-3 activo de longitud completa (20 µg/ml) y (4) suero humano inactivado por calor.

Resultados:

20 La figura 45 ilustra esquemáticamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de los eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante, según se determinó por fotometría) de los eritrocitos de conejo recubiertos con manano, en un intervalo de concentraciones séricas en: (1) suero humano normal; (2) suero de un paciente con 3MC; (3) suero de un paciente con 3MC más rMASP-3 activo de longitud completa (20 µg/ml) y (4) suero humano inactivado por calor, medido en ausencia de Ca<sup>++</sup>. Tal como se muestra en la figura 45, el porcentaje de lisis de RBC de conejo es significativamente mayor en el suero de un paciente con 3MC, incluso con rMASP-3, en comparación con el porcentaje de lisis en el suero del paciente con 3MC sin rMASP-3 (p = 0,0006).

25 La figura 46 ilustra esquemáticamente el porcentaje de lisis de los eritrocitos de conejo en el suero humano al 7 % del paciente 2 con 3MC y del paciente 3 con 3MC, que contiene rMASP-3 activo, en un intervalo de concentración de 0 a 110 µg/ml en BBS/Mg<sup>++</sup>/EGTA. Tal como se muestra en la figura 46, el porcentaje de lisis de RBC de conejo se restablece con la cantidad de rMASP-3 de una manera dependiente de la concentración, hasta el 100 % de actividad.

30 Experimento 5: el suero del paciente con deficiencia de la MASP-3 (CMC) tiene MASP-2 funcional, si la MBL está presente.

Métodos:

35 Se llevó a cabo un ensayo de depósito de C3b usando placas de ELISA recubiertas con manano, a fin de examinar si el suero del paciente con 3MC es con deficiencia en LEA-2. Se diluyó plasma de citrato en tampón BBS, recurriendo a diluciones en serie (comenzando a 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) y se sembró en placas revestidas con manano. El C3b depositado se detectó usando un ensayo con C3b anti-humano de pollo. El depósito de C3b impulsado por el LEA-2 (las diluciones de plasma son altas para que la AP y el LEA-1 funcionen) en placas de ELISA revestidas con manano se evaluó como una función de la concentración sérica humana en el suero de un sujeto humano normal (NHS), en el de dos pacientes con 3MC (paciente 2 y paciente 3), en el de los padres del paciente 3 y en el de un sujeto con deficiencia en MBL.

Resultados:

45 La figura 47 ilustra esquemáticamente el nivel de depósito de C3b impulsado por el LEA-2 (es decir, impulsado por la MASP-2) sobre unas placas de ELISA revestidas con manano, como una función de la concentración de suero humano diluido en tampón BBS, para el suero de un sujeto humano normal. (NHS), para el de dos pacientes con 3MC (paciente 2 y paciente 3), para el de los padres del paciente 3 y para el de un sujeto con deficiencia en MBL. Estos datos indican que el paciente 2 tiene suficiencia de MBL. Sin embargo, el paciente 3 y la madre del paciente 3 tienen deficiencia en MBL y, por lo tanto, su suero no deposita C3b sobre el manano, mediante el LEA-2. La sustitución de MBL en estos sueros restaura el depósito de C3b mediada por el LEA-2 en el suero del paciente 3 (que es homocigótico para el SNP que conduce a la deficiencia de la MASP-3) y su madre (que es heterocigótica para el alelo mutante de la MASP-3) (datos no mostrado). Este hallazgo demuestra que el suero del paciente con 3MC no es con deficiencia en LEA-2, sino que parece tener MASP-2 funcional y MASP-1 funcional.

Resumen general y conclusiones:

Estos resultados demuestran que la deficiencia de la MASP-3 en el suero humano da como resultado la pérdida de la actividad de la AP, tal como se manifiesta en un menor depósito de C3b en los pocillos revestidos con zimosano y en una menor lisis de los eritrocitos de conejo. La AP puede restaurarse en ambos ensayos suplementando los sueros con MASP-3 humana recombinante funcional.

5



ES 2 670 668 T3

20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
100 105 110

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu  
180 185

<210> 3

5 <211> 170

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp  
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His  
35 40 45

10 Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu



ES 2 670 668 T3

gaacatggcc cattctgtgg gaagacattg ccccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg 840  
 gtgaccatca cctttgtcac agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac 900  
 acgagcacag cgcagccttg cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct 960  
 gtgcaagcca aatacatcct gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag 1020  
 cttctgcaag gtcacttgcc cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct 1080  
 tgggaccggc caatgcccgc gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc 1140  
 agtggccgag tggagtacat cacaggctct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag 1200  
 tacagctgtg aagagacctt ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag 1260  
 gctgatggat tctggacgag ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctggt 1320  
 tgtggactat cagcccgcac aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaaacct 1380  
 ggtgatthttc cttggcaagt cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactthta 1440  
 tatgacaact gggtoctaac agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc 1500  
 gccctggaca ttcgaatggg caccctgaaa agactatcac ctattatac acaagcctgg 1560  
 tctgaagctg tttttataca tgaaggttat actcatgatg ctggccttga caatgacata 1620  
 gcactgatta aattgaataa caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg 1680  
 ccaagaaaag aagctgaatc ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg 1740  
 ggattaaccc aaaggggttt tcttgctaga aatctaattg atgtcgacat accgattggt 1800  
 gaccatcaaa aatgtactgc tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact 1860  
 gctaacatgc tttgtgctgg cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc 1920  
 ggagggggcac tggtgtttct agatagttaa acagagaggt ggthtgtggg aggaatagtg 1980  
 tcctgggggt ccatgaattg tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt 2040  
 aactatattc cctggatcga gaacataatt agtgatthtt aacttgcgtg tctgcagtca 2100  
 aggattcttc atthtttagaa atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc 2160  
 attcatcatt actgtggaca tggcagttgt tgctccacc aaaaaacag actccaggtg 2220  
 aggtgctgtg catttctcca cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg 2280  
 gacataaacc acgagagtga cagtcactct tccccacca gtgtaatgtc actgctcaaa 2340  
 ttacatttca ttaccttaa aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta 2400  
 aactgcctgt ccatgctctt tgthtttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460

5 <210> 5  
 <211> 686  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

ES 2 670 668 T3

<400> 5

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr  
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser  
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr  
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser  
100 105 110

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val  
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu  
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg  
180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu  
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile  
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu  
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly  
245 250 255

ES 2 670 668 T3

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn  
 260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly  
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met  
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu  
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln  
 325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro  
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly  
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe  
 385 390 395 400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly  
 405 410 415

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro  
 420 425 430

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly  
 435 440 445

Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly  
 450 455 460

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr  
 465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp  
 485 490 495

Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala

ES 2 670 668 T3

500 505 510

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly  
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile  
530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser  
545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr  
565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile  
580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro  
595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly  
610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
625 630 635 640

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
645 650 655

Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
660 665 670

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
675 680 685

<210> 6  
<211> 671  
5 <212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 6  
Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp  
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His

10

ES 2 670 668 T3

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

ES 2 670 668 T3

Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile  
 290 295 300

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu  
 305 310 315 320

Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp  
 325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly  
 340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro  
 355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr  
 370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp  
 385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu  
 405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly  
 420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu  
 435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu  
 450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu  
 465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln  
 485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala  
 500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val  
 515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu  
 530 535 540

ES 2 670 668 T3

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu  
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro  
565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr  
580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser  
595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe  
610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp  
625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys  
645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
660 665 670

<210> 7

<211> 3895

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 7

attccggcac agggacacaa acaagctcac ccaacaaagc caagctggga ggaccaaggc	60
cgggcagccg ggagcaccca aggcaggaaa atgaggtggc tgcttctcta ttatgctctg	120
tgcttctccc tgtcaaaggc ttcagcccac accgtggagc taaacaatat gtttgccag	180
atccagtgcg ctggttatcc agactcctat cccagtgatt cagaggtgac ttggaatatic	240
actgtcccag atggggttctg gatcaagctt tacttcatgc acttcaactt ggaatcctcc	300
tacctttgtg aatatgacta tgtgaaggta gaaactgagg accaggtgct ggcaaccttc	360
tgtggcaggg agaccacaga cacagagcag actcccggcc aggaggtggt cctctcccct	420
ggctccttca tgtccatcac tttccggtca gatttctcca atgaggagcg tttcacaggc	480
tttgatgcc actacatggc tgtggatgtg gacgagtgca aggagaggga ggacgaggag	540
ctgtcctgtg accactactg ccacaactac attggcggct actactgetc ctgccgcttc	600
ggctacatcc tccacacaga caacaggacc tgccgagtgg agtgcagtga caacctcttc	660
actcaaagga ctgggggtgat caccagccct gacttcccaa acccttacc caagagctct	720

5

10

ES 2 670 668 T3

gaatgcctgt ataccatcga gctggaggag ggtttcatgg tcaacctgca gtttgaggac 780  
 atatttgaca ttgaggacca tctgaggtg ccctgccct atgactacat caagatcaaa 840  
 gttggtccaa aagttttggg gcctttctgt ggagagaaag cccagaacc catcagcacc 900  
 cagagccaca gtgtcctgat cctgttccat agtgacaact cgggagagaa ccggggctgg 960  
 aggctctcat acagggtgc aggaaatgag tgcccagagc tacagcctcc tgtccatggg 1020  
 aaaatcgagc cctccaagc caagtatttc ttcaaagacc aagtgtcgt cagctgtgac 1080  
 acaggctaca aagtgtgaa ggataatgtg gagatggaca cattccagat tgagtgtctg 1140  
 aaggatggga cgtggagtaa caagattccc acctgtaaaa ttgtagactg tagagcccca 1200  
 ggagagctgg aacacgggct gatcaccttc tctacaagga acaacctcac cacatacaag 1260  
 tctgagatca aatactcctg tcaggagccc tattacaaga tgctcaacaa taacacaggt 1320  
 atataacct gttctgccca aggagtctgg atgaataaag tattggggag aagcctacct 1380  
 acctgccttc cagagtgtgg tcagccctcc cgctccctgc caagcctggt caagaggatc 1440  
 attgggggcc gaaatgctga gcctggcctc tcccgtggc aggcctgat agtgggtggag 1500  
 gacacttcca gagtgccaaa tgacaagtgg tttgggagtg gggccctgct ctctgcgtcc 1560  
 tggatcctca cagcagctca tgtgtcgcgc tccagcgtg gagacaccac ggtgatacca 1620  
 gtctccaagg agcatgtcac cgtctacctg ggcttgcatg atgtgcgaga caaatcgggg 1680  
 gcagtcaaca gctcagctgc ccgagtgggt ctccaccag acttcaacat ccaaaaactac 1740  
 aaccaogata tagctctggt gcagctgcag gagcctgtgc ccctgggacc ccacgttatg 1800  
 cctgtctgcc tgccaaggct tgagcctgaa ggccccgccc cccacatgct gggcctggtg 1860  
 gccggctggg gcatctccaa tcccaatgtg acagtggatg agatcatcag cagtggcaca 1920  
 cggaccttgt cagatgtcct gcagtatgtc aagttaccog tgggtgcctca cgtgagtgc 1980  
 aaaactagct atgagtcccg ctccggcaat tacagcgtca cggagaacat gttctgtgct 2040  
 ggctactacg agggcggcaa agacacgtgc cttggagata gcggtggggc ctttgtcatc 2100  
 tttgatgact tgagccagcg ctgggtgggt caaggcctgg tgcctgggg gggacctgaa 2160  
 gaatgcggca gcaagcaggt ctatggagtc tacacaaagg tctccaatta cgtggactgg 2220  
 gtgtgggagc agatgggctt accacaaagt gttgtggagc cccaggtgga acggtgagct 2280  
 gacttacttc ctccgggctt gcctcccctg agcgaagcta caccgcaett ccgacagcac 2340  
 actccacatt acttatcaga ccatatggaa tggaacacac tgacctagcg gtggcttctc 2400  
 ctaccgagac agccccagc accctgagag gcagagtgtg gtataggaa aaggctccag 2460  
 gcaggagacc tgtgttctctg agcttgccta agtctcttcc cctgtctggg cctcaactca 2520  
 ccgagtaata caatgcagga gctcaaccaa ggccctctgt ccaateccag cactccttcc 2580  
 caggccatgc ttcttaccct agtggccttt attcactcct gaccacttat caaacccatc 2640

ES 2 670 668 T3

ggtcctactg ttggtataac tgagcttggg cctgactatt agaaaatggt ttctaacatt 2700  
 gaactgaatg cgcacatctgt atattttcct gctctgcctt ctgggactag ccttggccta 2760  
 atccttcctc taggagaaga gcattcaggt tttgggagat ggctcatagc caagcccctc 2820  
 tctcttagtg tgatcccttg gagcaccttc atgcctgggg tttctctccc aaaagcttct 2880  
 tgcagtctaa gccttatccc ttatgttccc cattaagga atttcaaaag acatggagaa 2940  
 agttgggaag gtttgtgctg actgctggga gcagaatagc cgtgggaggc ccaccaagcc 3000  
 cttaaattcc cattgtcaac tcagaacaca tttgggcca tatgccacc cccaacacca 3060  
 gctgacacca tgggggtcca cacctgctgc tccagacaag cacaaagcaa tctttcagcc 3120  
 ttgaaatgta ttatctgaaa ggctacctga agcccaggcc cgaatatggg gacttagtgc 3180  
 attacctgga aaaagaaaag acccacactg tgcctgctg tgcttttggg caggaaaatg 3240  
 gaagaaagag tgggggtggg acattagaag tcacccaaat cctgccaggc tgcctggcat 3300  
 ccctggggca tgagctgggc ggagaatcca ccccgagga tgttcagagg gaccactcc 3360  
 ttcatttttc agagtcaaag gaatcagagg ctcacccatg gcaggcagtg aaaagagcca 3420  
 ggagtcctgg gttctagtcc ctgctctgcc cccaactggc tgtataacct ttgaaaaatc 3480  
 attttcttg tctgagtctc tggttctccg tcagcaacag gctggcataa ggtcccctgc 3540  
 aggttccttc tagctggagc actcagagct tcctgactg ctagcagcct ctctggcct 3600  
 cacagggtg attgttctcc ttctccctgg agctctctct cctgaaaatc tccatcagag 3660  
 caaggcagcc agagaagccc ctgagagggg atgattggga agtgtccact ttctcaaccg 3720  
 gctcatcaaa cacactcctt tgtctatgaa tggcacatgt aaatgatgtt atattttgta 3780  
 tcttttatat catatgcttc accattctgt aaagggctc tgcattgttg ctcccatcag 3840  
 gggctcctcaag tggaaataaa ccctcgtgga taacccaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3895

<210> 8  
 <211> 728  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

5

<400> 8  
 Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp  
 35 40 45

10

ES 2 670 668 T3

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His  
 50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val  
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr  
 85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser  
 100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe  
 115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys  
 130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr  
 145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr  
 165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln  
 180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys  
 195 200 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val  
 210 215 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val  
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu  
 245 250 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser  
 260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg  
 275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu  
 290 295 300

ES 2 670 668 T3

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe  
305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu  
325 330 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp  
340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg  
355 360 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn  
370 375 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Lys Tyr Ser Cys Gln Glu Pro  
385 390 395 400

Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Asn Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala  
405 410 415

Gln Gly Val Trp Met Asn Lys Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys  
420 425 430

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

Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln  
450 455 460

Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp  
465 470 475 480

Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Ala Ser Trp Ile Leu Thr Ala Ala  
485 490 495

His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile Pro Val Ser  
500 505 510

Lys Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His Asp Val Arg Asp Lys  
515 520 525

Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val Val Leu His Pro Asp  
530 535 540

Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Gln  
545 550 555 560

ES 2 670 668 T3

Glu Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro Val Cys Leu Pro Arg  
 565 570 575

Leu Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro His Met Leu Gly Leu Val Ala Gly  
 580 585 590

Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser  
 595 600 605

Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val  
 610 615 620

Val Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn  
 625 630 635 640

Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly  
 645 650 655

Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Phe Asp  
 660 665 670

Asp Leu Ser Gln Arg Trp Val Val Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly  
 675 680 685

Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
 690 695 700

Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu Gln Met Gly Leu Pro Gln Ser  
 705 710 715 720

Val Val Glu Pro Gln Val Glu Arg  
 725

<210> 9  
 <211> 2852  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 9  
 tggcgataca ttcacacagg aacagctatg ccatgtttac gaattccggt tttgaaaaa 60  
 ctttcgttga cagttacaca aagggtcact tcctccccag cgacacatgg gcctctcaa 120  
 ggagaggagg gagtaagtcc cacggtaggg ccagtgggtg ctccctgggt tttggaatca 180  
 tttctgcgga gctttcaagg ccagaccctg ggcttagggt cgagacttta tagcagtgc 240  
 agccagaccc agcaagatgg ctgcgaccgt gaaaccctgg gcggcgatcc ggggtgcgat 300  
 catgagctga gagcgctggc tgttgccccg gtggaaggag tagaggccgt aggtgagggc 360

10

ES 2 670 668 T3

ggccgccgtg gccaggcaac ctatgggtac caccgggttc tcgcgggcaa gtcaagctgg 420  
gaggaccaag gccgggcagc cgggagcacc caaggcagga aaatgaggtg gctgcttctc 480  
tattatgctc tgtgcttctc cctgtcaaag gcttcagccc acaccgtgga gctaaacaat 540  
atgtttggcc agatccagtc gcctgggttat ccagactcct atcccagtga ttcagaggtg 600  
acttgaata tcaactgtccc agatgggttt cggatcaagc tttacttcat gcacttcaac 660  
ttggaatcct cctacctttg tgaatatgac tatgtgaagg tagaaactga ggaccaggtg 720  
ctggcaacct tctgtggcag ggagaccaca gacacagagc agactcccgg ccaggaggtg 780  
gtcctctccc ctggctcctt catgtccatc actttccggt cagatttctc caatgaggag 840  
cgtttcacag gctttgatgc ccactacatg gctgtggatg tggacgagtg caaggagagg 900  
gaggacgagg agctgtcctg tgaccactac tgccacaact acattggcgg ctactactgc 960  
tcctgccgct tcggctacat cctccacaca gacaacagga cctgccgagt ggagtgcagt 1020  
gacaacctct tcaactcaaag gactgggggtg atcaccagcc ctgacttccc aaacccttac 1080  
cccaagagct ctgaatgcct gtataccatc gagctggagg agggtttcat ggtcaacctg 1140  
cagtttgagg acatatttga cattgaggac catcctgagg tgccctgccc ctatgactac 1200  
atcaagatca aagttgtcc aaaagttttg gggcctttct gtggagagaa agccccagaa 1260  
cccatcagca ccagagcca cagtgtcctg atcctgttcc atagtgaaa ctccggagag 1320  
aacccgggct ggaggctctc atacagggct gcaggaaatg agtgcccaga gctacagcct 1380  
cctgtccatg ggaaaatcga gccctcccaa gccaaagtatt tcttcaaaga ccaagtgtc 1440  
gtcagctgtg acacaggcta caaagtgtg aaggataatg tggagatgga cacattccag 1500  
attgagtgtc tgaaggatgg gacgtggagt aacaagatc ccacctgtaa aattgtagac 1560  
tgtagagccc caggagagct ggaacacggg ctgatcacct tctctacaag gaacaacctc 1620  
accacataca agtctgagat caaatactcc tgtcaggagc cctattaaa gatgctcaac 1680  
aataaacacag gtatatatac ctgttctgcc caaggagtct ggatgaataa agtattgggg 1740  
agaagcctac ccacctgcct tccagtgtgt gggctcccca agttctcccg gaagctgatg 1800  
gccaggatct tcaatggacg ccagcccag aaaggcacca ctccctggat tgccatgctg 1860  
tcacacctga atgggcagcc cttctgcgga ggctcccttc taggctccag ctggatcgtg 1920  
accgccgcac actgcctcca ccagtcactc gatccgaaag atccgaccct acgtgattca 1980  
gacttgetca gcccttctga cttcaaaatc atcctgggca agcattggag gctccgggtca 2040  
gatgaaaatg aacagcatct cggcgtaaaa cacaccactc tccaccccaa gtatgatccc 2100  
aacacattcg agaatgacgt ggctctgggtg gagctgttgg agagcccagt gctgaatgcc 2160  
ttcgtgatgc ccatctgtct gcctgagggg cccagcaggg aaggagccat ggtcatcgtc 2220

ES 2 670 668 T3

agcggctggg gaaagcagtt cttgcaaagg ttcccagaga ccctgatgga gattgaaatc 2280  
 ccgattgttg accacagcac ctgccagaag gcttatgccc cgctgaagaa gaaagtgacc 2340  
 agggacatga tctgtgctgg ggagaaggaa gggggaaagg acgcctgttc gggtgactct 2400  
 ggaggcccca tggtgaccct gaatagagaa agaggccagt ggtacctggt gggcactgtg 2460  
 tcctgggggtg atgactgtgg gaagaaggac cgctacggag tatactctta catccaccac 2520  
 aacaaggact ggatccagag ggtcaccgga gtgaggaact gaatttggt cctcagcccc 2580  
 agcaccacca gctgtgggca gtcagtagca gaggacgatc ctccgatgaa agcagccatt 2640  
 tctcctttcc ttctcccat cccccctcct tcggcctatc cactactggg caatagagca 2700  
 ggtatcttca ccccttttc actctcttta aagagatgga gcaagagagt ggtcagaaca 2760  
 caggccgaat ccaggctcta tcacttacta gttttcagtt ctgggcaggt gacttcatct 2820  
 cttcgaactt cagtttcttc ataagatgga aa 2852

<210> 10

<211> 699

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys  
 1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln  
 20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp  
 35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His  
 50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val  
 65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr  
 85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser  
 100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe  
 115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys

10



ES 2 670 668 T3

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

ES 2 670 668 T3

Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Thr Leu Asn Arg Glu  
645 650 655

Arg Gly Gln Trp Tyr Leu Val Gly Thr Val Ser Trp Gly Asp Asp Cys  
660 665 670

Gly Lys Lys Asp Arg Tyr Gly Val Tyr Ser Tyr Ile His His Asn Lys  
675 680 685

Asp Trp Ile Gln Arg Val Thr Gly Val Arg Asn  
690 695

<210> 11

<211> 380

<212> PRT

<213> homo sapiens

5

<400> 11

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys  
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln  
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp  
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His  
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val  
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr  
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser  
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe  
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys  
130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr  
145 150 155 160

ES 2 670 668 T3

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr  
 165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln  
 180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys  
 195 200 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val  
 210 215 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val  
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu  
 245 250 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser  
 260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg  
 275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu  
 290 295 300

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe  
 305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu  
 325 330 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp  
 340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Lys Asn Glu Ile Asp  
 355 360 365

Leu Glu Ser Glu Leu Lys Ser Glu Gln Val Thr Glu  
 370 375 380

<210> 12  
 <211> 2091  
 <212> ADN  
 <213> rattus

5

ES 2 670 668 T3

<400> 12

tggcacacaa	tgaggctact	gatcgtcctg	ggtctgcttt	ggagtttgg	ggccacactt	60
ttgggctcca	agtggcctga	gcctgtattc	gggcgctgg	tgtccctggc	cttcccagag	120
aagtatggca	accatcagga	togatcctgg	acgctgactg	caccccctgg	cttccgctg	180
cgcctctact	tcaccactt	caacctggaa	ctctettacc	gctgcgagta	tgactttgtc	240
aagttgacct	cagggaccaa	ggtgctagcc	acgctgtgtg	ggcaggagag	tacagatact	300
gagcggggcac	ctggcaatga	caccttctac	tactgggtc	ccagcctaaa	ggtcaccttc	360
cactccgact	actccaatga	gaagccattc	acaggatttg	aggccttcta	tgcagcggag	420
gatgtggatg	aatgcagaac	atccctggga	gactcagtcc	cttgtgacca	ttattgccac	480
aactacctgg	gcggtacta	ctgctcctgc	cgagtgggct	acattctgca	ccagaacaag	540
catacctgct	cagccctttg	ttcaggccag	gtgttctactg	ggaggtctgg	ctttctcagt	600
agccttgagt	accacagcc	ataccocaaa	ctctccagct	gcgcctacaa	catccgctg	660
gaggaaggct	tcagtatcac	cctggacttc	gtggagtcc	ttgatgtgga	gatgcaccct	720
gaagcccagt	gcccctacga	ctccctcaag	attcaaacag	acaagaggga	atacggcccg	780
ttttgtggga	agacgctgcc	ccccaggatt	gaaactgaca	gcaacaaggt	gaccattacc	840
tttaccaccg	acgagtccag	gaaccacaca	ggctggaaga	tactactacac	aagcacagca	900
cagccctgcc	ctgatccaac	ggcgccacct	aatggtcaca	tttcacctgt	gcaagccacg	960
tatgtcctga	aggacagctt	ttctgtcttc	tgcaagactg	gcttcgagct	tctgcaaggt	1020
tctgtcccc	tgaagtccatt	cactgctgtc	tgtcagaaag	atggatcttg	ggaccggccg	1080
ataccagagt	gcagcattat	tgactgtggc	cctcccgatg	acctacccaa	tggccacgtg	1140
gactatatca	caggccctga	agtgaccacc	tacaaagctg	tgattcagta	cagctgtgaa	1200
gagactttct	acacaatgag	cagcaatggt	aaatatgtgt	gtgaggctga	tggattctgg	1260
acgagctcca	aaggagaaaa	atccctccc	gtttgcaagc	ctgtctgtgg	actgtccaca	1320
cacacttcag	gaggccgtat	aattggagga	cagcctgcaa	agcctggtga	ctttccttgg	1380
caagtcttgt	tactgggtga	aactacagca	gcagggtgtc	ttatacatga	cgactgggtc	1440
ctaacagcgg	ctcatgctgt	atatgggaaa	acagaggcga	tgtcctccct	ggacatccgc	1500
atgggcatcc	tcaaaaaggct	ctccctcatt	tactactcaag	cctggccaga	ggctgtcttt	1560
atccatgaag	gctacactca	cggagctggt	tttgacaatg	atatagcact	gattaaactc	1620
aagaacaaag	tcacaatcaa	cagaaacatc	atgccgattt	gtctaccaag	aaaagaagct	1680
gcacocctaa	tgaaaaacaga	cttcgttggg	actgtggctg	gctgggggtt	aaccagaag	1740
gggtttcttg	ctagaaacct	aatgtttgtg	gacataccaa	ttgttgacca	ccaaaaatgt	1800
gctactgcgt	atacaaagca	gccctaccca	ggagcaaaag	tgactgttaa	catgctctgt	1860
gctggcctag	accgcgggtg	caaggacagc	tgcagaggtg	acagcggagg	ggcattagtg	1920
tttctagaca	atgaaacaca	gagatggttt	gtgggaggaa	tagtttctctg	gggttctatt	1980
aactgtgggg	ggtcagaaca	gtatgggtc	tacacgaaag	tcacgaacta	tattccctgg	2040
attgagaaca	taataaataa	tttctaattt	gcaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a	2091

5

<210> 13

<211> 685

ES 2 670 668 T3

<212> PRT  
<213> rattus

<400> 13

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr  
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser  
 20 25 30

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr  
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe  
 50 55 60

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr  
 65 70 75 80

Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp  
 85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser  
 100 105 110

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr  
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr  
 130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu  
 145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn  
 165 170 175

Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg  
 180 185 190

ES 2 670 668 T3

Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu  
 195 200 205

Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr  
 210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln  
 225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly  
 245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn  
 260 265 270

Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly  
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr  
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu  
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln  
 325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro  
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu  
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe  
 385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe  
 405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val  
 420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln  
 435 440 445

ES 2 670 668 T3

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu  
450 455 460

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala  
465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile  
485 490 495

Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp  
500 505 510

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe  
515 520 525

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn  
530 535 540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu  
545 550 555 560

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln  
565 570 575

Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val  
580 585 590

Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly  
595 600 605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly  
610 615 620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp  
625 630 635 640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser  
645 650 655

Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr  
660 665 670

Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe  
675 680 685

<210> 14  
<211> 354  
5 <212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
10 <223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 14  
 caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60  
 acctgcaccg tctctgggtt ctactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120  
 cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt ttctgagtga cgaaaaatcc 180  
 tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240  
 gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300  
 cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 15  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> Sintético

<400> 15  
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly  
 20 25 30  
 Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15  
 <210> 16  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

- 5 <210> 17
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintético

<400> 17

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr  
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val  
85 90 95

- 15 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105

- <210> 18
- <211> 324

ES 2 670 668 T3

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 18  
 tcctatgagc tgatacagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaccatt 60  
 acctgtgcgg gagacaacct tgggaagaaa cgtgtgcact ggtaccagca gaggccaggc 120  
 caggccoctg tgttggatcat ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgaccga 180  
 ttctctgctt ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcaactagggg ogaagccggg 240  
 gatgaggccg actattattg tcaggtgtgg gacattgcta ctgatcatgt ggtcttcggc 300  
 ggagggacca agctcaccgt ccta 324

10 <210> 19  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintético

<400> 19  
 Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser  
 50 55 60  
 20 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His  
 85 90 95  
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly  
 100 105 110  
 Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 115 120

25 <210> 20  
 <211> 262  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

30

ES 2 670 668 T3

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser  
 115 120 125

Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Ser Tyr  
 130 135 140

Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala  
 145 150 155 160

Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val His Trp  
 165 170 175

Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Asp Asp  
 180 185 190

Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Asn Ser  
 195 200 205

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly Asp Glu  
 210 215 220

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His Val Val  
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly Ser Glu  
 245 250 255

Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 260

5

<210> 21  
 <211> 245

ES 2 670 668 T3

<212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

5

<400> 21  
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly  
 20 25 30  
 Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Pro Val Leu Thr  
 130 135 140  
 Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr Gln Asp Lys Gln Arg  
 180 185 190  
 Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr  
 195 200 205  
 Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Thr Val Leu  
 245

10

ES 2 670 668 T3

	<210> 22	
	<211> 750	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
10	<400> 22	
	caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctgcagac cctctcactc	60
	acctgtgcc a tctccggga cagtgtctct agcaccagtg ctgcttgaa ctggatcagg	120
	cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat	180
	aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac	240
	cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca	300
	agagatcctt tccgggtacc ttttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct	360
	tcaaagcttt cagggagtgc atccgcccc aaacttgaag aaggtgaatt ttcagaagca	420
	cgcgatcct atgagctgat acagccaccc tccgtgtcag tggccccagg acagacggcc	480
	accattacct gtgcgggaga caaccttggg aagaaacgtg tgcactggta ccagcagagg	540
	ccaggccagg ccctgtgtt ggtcatctat gatgatagcg accggccctc agggatccct	600
	gaccgattct ctgcctccaa ctctgggaac acggccaccc tgaccatcac taggggcgaa	660
	gccggggatg aggccgacta ttattgtcag gtgtgggaca ttgctactga tcatgtggtc	720
	ttcggcggag ggaccaagct caccgtccta	750
15	<210> 23	
	<211> 735	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Sintético	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
25	<222> (663)..(663)	
	<223> n es a, c, g, o t	

ES 2 670 668 T3

<400> 23  
caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctgggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60  
acctgcaccg tctctggggtt ctactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120  
cagcccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc 180  
tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240  
gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300  
cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaactgtctc ctcaaagctt 360  
tcagggagtg catccgcccc aaaactttaa gaaggtgaat tttcagaagc acgcgtacag 420  
ccagtgtgta ctacgcccc ctactgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc 480  
tgctctggag agaattggg ggataaatat gcttactggg atcagcagaa gccaggccag 540  
tcccctgtgt tggctatgta tcaagataaa cagcggccct cagggatccc tgagcgattc 600  
tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 660  
gangctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg cggtattcgg cggagggacc 720  
aagctgaccg tccta 735

5 <210> 24  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintético

<400> 24  
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn  
20 25 30  
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly Ser Gly Thr Arg Tyr Ala Pro Ala Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg  
65 70 75 80  
Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Lys Cys Ala Tyr Ser Ser Gly Cys Asp Tyr Glu Gly Gly Tyr Ile  
100 105 110  
Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120 125

15 <210> 25  
<211> 118

ES 2 670 668 T3

<212> PRT  
<213> secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sintético

<400> 25  
Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
35 40 45

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

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg  
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser Gly Asn Val Gly Asp Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr  
100 105 110

10 Glu Val Ile Val Ser Ser  
115

<210> 26  
<211> 128  
<212> PRT  
15 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 26

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gln Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Arg Phe Gly Asn Ser Thr Gly His Gly Ala Ala Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Val Arg  
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Gly Val Tyr Gly Tyr Cys Gly Ser Tyr Ser Cys Cys Gly Val  
100 105 110

Asp Thr Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 27

5 <211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 27

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val  
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile  
35 40 45

Tyr Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala  
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

15 <210> 28

<211> 108

ES 2 670 668 T3

<212> PRT  
<213> secuencia artificial

5 <220>  
<223> Sintético

<400> 28  
Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val  
1 5 10 15  
  
Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr  
20 25 30  
  
Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu  
35 40 45  
  
Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser  
50 55 60  
  
Gly Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg  
65 70 75 80  
  
Ala Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly  
85 90 95  
  
Ala Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

10 <210> 29  
<211> 107  
<212> PRT  
15 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> Sintético

20 <400> 29  
Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val  
1 5 10 15  
  
Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30  
  
Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile  
35 40 45  
  
Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
  
Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80  
  
Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala  
85 90 95  
  
Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

ES 2 670 668 T3

<210> 30  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

<400> 30  
 Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

10

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Tyr Lys Ser Gly Ala Gly Thr Asn Tyr Ala Pro Ala Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Thr Thr Gly Ser Gly Cys Ser Ser Gly Tyr Arg Ala Glu Tyr  
 100 105 110

Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

15

<210> 31  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 31

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val  
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala  
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
100 105

- 5 <210> 32
- <211> 126
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintético

<400> 32

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Asn Asp Gly Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ser Ala  
50 55 60

Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val  
65 70 75 80

Arg Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Trp Phe Asp Ala Gly Gln  
100 105 110

Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser  
115 120 125

- 15 <210> 33
- <211> 107

ES 2 670 668 T3

<212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Sintético

<400> 33  
 Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val  
 1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr  
 20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala  
 65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala  
 85 90 95

10 Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 34  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 15 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

20 <400> 34  
 Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn  
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Phe Cys Thr Arg Lys  
 20 25 30

Leu Cys Tyr Gln  
 35

25 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintético

30



ES 2 670 668 T3

<400> 36

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
210 215 220

Pro Gly Lys  
225

- 5 <210> 37
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 37  
 Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Arg Ser  
 1 5 10

5 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintético

<400> 38  
 Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser  
 1 5 10

15 <210> 39  
 <211> 888  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintético

<400> 39  
 atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattog 60  
 ctcgaggtga catgtgaacc cggtagcagc tttaaggata agtgcaacac atgtaggtgc 120  
 ggtagcagc gcaaatcagc gttctgtacc cggaaattgt gctaccaggg aactggagga 180  
 gggtcggggc cctcgtcaag atctgacaaa actcacacat gccaccgtg ccagcacct 240  
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg 300  
 atctcccga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 360  
 gtcaagtca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg 420  
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 480  
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 540  
 gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc 600  
 ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 660  
 tatcccagc acatgccctg ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 720  
 25 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 780  
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca cgaggctctg 840  
 cacaaccact acagcagaa ggcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 888

30 <210> 40  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Sintético

ES 2 670 668 T3

<400> 40

Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn  
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Phe Cys Thr Arg Lys  
 20 25 30

Leu Cys Tyr Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Arg Ser  
 35 40 45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 50 55 60

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 85 90 95

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 100 105 110

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 115 120 125

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 130 135 140

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 145 150 155 160

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 165 170 175

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 180 185 190

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 195 200 205

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 210 215 220

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 225 230 235 240

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 245 250 255

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 260 265 270

Pro Gly Lys  
 275

ES 2 670 668 T3

<210> 41  
 <211> 888  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Sintético

<400> 41  
 atgtacagga tgcaactcct gtcttgatt gcactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60  
 ttggaagtga cgtgtgagcc cggaacgaca ttcaaagaca agtgcaatac ttgtcgggtgc 120  
 ggttcagatg ggaaatcggc ggtctgcaca aagctctggg gtaaccaggg caccggtgga 180  
 gggtcgggat ccagctcaag atctgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct 240  
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 300  
 atctcccgga cccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 360  
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg 420  
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 480  
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 540  
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 600  
 ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggettc 660  
 tatcccagcg acatgcctgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 720  
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 780  
 10 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca cgaggctctg 840  
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcgg gtaaatga 888

10

<210> 42  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Sintético

20

ES 2 670 668 T3

<400> 42

Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn  
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu  
 20 25 30

Trp Cys Asn Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Arg Ser  
 35 40 45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 50 55 60

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 65 70 75 80

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 85 90 95

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 100 105 110

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 115 120 125

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 130 135 140

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 145 150 155 160

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 165 170 175

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 180 185 190

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 195 200 205

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 210 215 220

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 225 230 235 240

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 245 250 255

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 260 265 270

Pro Gly Lys  
 275

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3, eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de la MASP-3, para usar en el tratamiento de un sujeto que padece de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), en la que dicho agente inhibidor de la MASP-3 es un anticuerpo monoclonal de la MASP-3 o un fragmento del mismo que se une específicamente a una porción de la MASP-3 humana (ID. DE SEC. N.º 8).
- 10 2. Una composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende, además, al menos uno de los siguientes: un agente inhibidor de la MASP-1, un agente inhibidor de la MASP-2, una combinación de un agente inhibidor de la MASP-1 y un agente inhibidor de la MASP-2 y/o un inhibidor terminal del complemento que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5.
3. Una composición para su uso según la reivindicación 2, en la que el agente inhibidor de la MASP-1 es al menos uno de los siguientes:
- (i) un anticuerpo monoclonal MASP-1 o un fragmento del mismo, que se une específicamente a una porción de la ID. DE SEC. N.º 10;
- 15 (ii) un agente inhibidor de la MASP-1 que se une específicamente a una porción de la MASP-1, con una afinidad al menos 10 veces mayor que la que presenta para su unión a la MASP-3 (ID. DE SEC. N.º 8) y/o
- (iii) un agente inhibidor de la MASP-1 que se une específicamente al dominio de serina proteasa de la MASP-1 (aa 449-694 de la ID. DE SEC. N.º 10).
- 20 4. Una composición para su uso según la reivindicación 2, en la que el agente inhibidor de la MASP-2 es un anticuerpo monoclonal de la MASP-2 o un fragmento del mismo, que se une específicamente a una porción de la ID. DE SEC. N.º 5.
- 25 5. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en un sujeto que exhibe uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente: (i) niveles inferiores a los niveles normales de hemoglobina, (ii) niveles inferiores a los niveles normales de plaquetas; (iii) niveles superiores a los niveles normales de los insulinositos y (iv) niveles superiores a los niveles normales de bilirrubina; opcionalmente, en la que el sujeto se ha sometido con anterioridad a un tratamiento, o se está tratando actualmente, con un inhibidor de complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína C5 del de complemento.
- 30 6. Una composición para su uso según la reivindicación 2, en la que el inhibidor del complemento terminal es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o en la que dicho inhibidor es eculizumab.
7. La composición según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo monoclonal de la MASP-3 o un fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente: un anticuerpo recombinante, un anticuerpo que tiene una función efectora reducida, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado o humano.
- 35 8. La composición según la reivindicación 1, en la que la composición se formula para administración sistémica, por ejemplo, para la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial o como un inhalante.
9. Una composición para su uso según la reivindicación 1, que comprende una cantidad de un agente inhibidor de la MASP-3 eficaz para aumentar la supervivencia de los glóbulos rojos en un sujeto que padece de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).
- 40 10. Una composición para su uso según la reivindicación 9, que comprende además un agente inhibidor de la MASP-2.

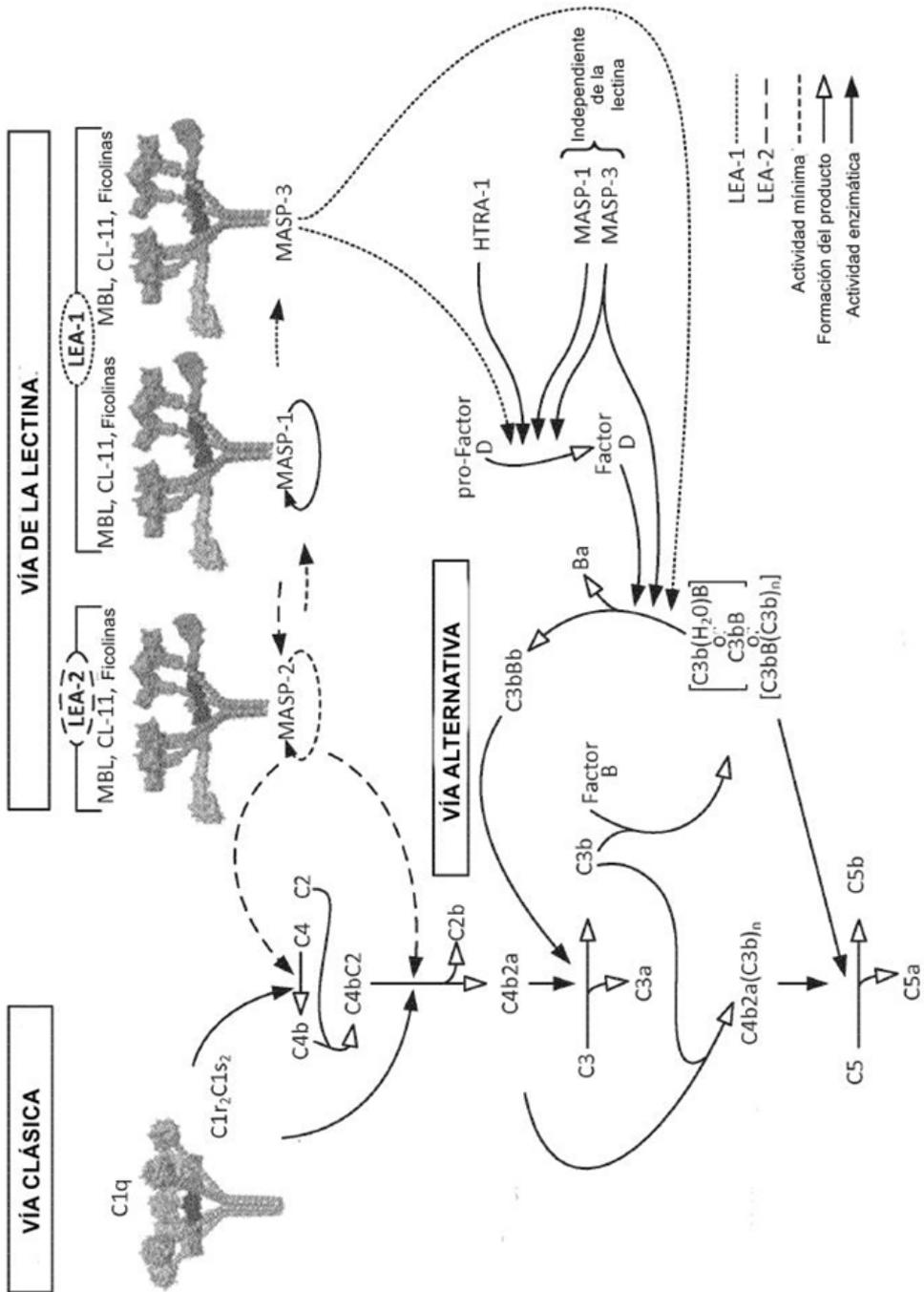


FIGURA 1

MAASP 2

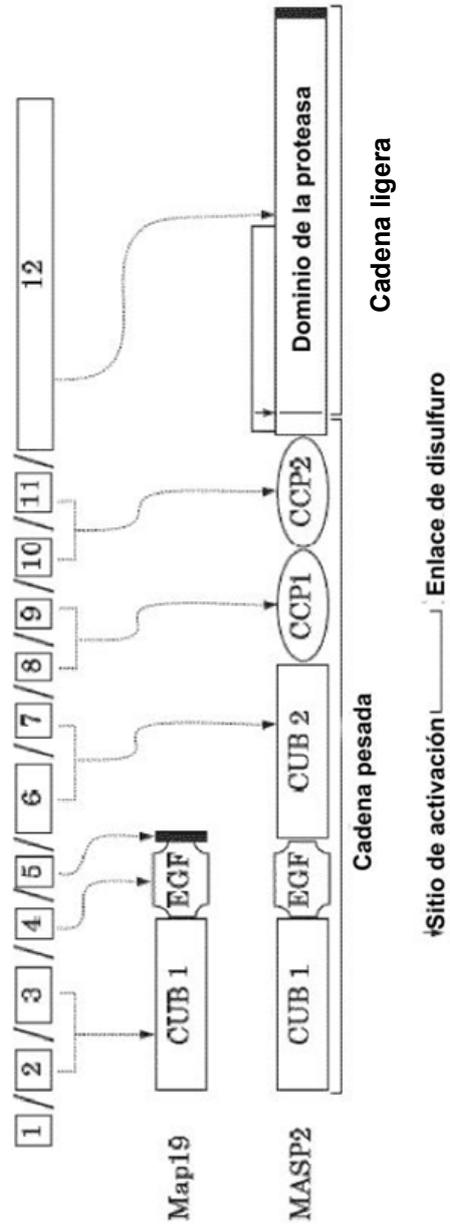


FIGURA 2





FIGURA 4

Alineación de las cadenas A de la MASP

		90
1	MRWLLLYALCFSLKASAHTELVNMFQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNIITVDPGFRIKLYFMHFNLESSYLCEIDYVKVETEDQVLATF	
MASP1_Achain	.....	
MASP3_Achain	.....	
MASP2_Achain	.L.T.LGL..G.VATPLGPKWP-EPV..RLA...F.GE.AN.Q.RR.TL.A.P.Y.LR...T.D.L.H.....F..LSSGAK.....L	
		180
91	CGRETTDTEQIPGQEVVLSFGSFSITFRSDFNEERFTGDAHMAVDVDEKEREDEELSCDHCHNYIGGYCSCRFGYILHTDNRI	
MASP1_Achain	.....	
MASP3_Achain	.....	
MASP2_Achain	.Q.S.....RA..KDTFY.L.SLD.....K.P.....E.F.A.E.I.....QVAPG.AP.....H.....HL.F.....A.V..RNK...	
		270
181	CRVECSNLFRTQRTGVTSPDPNPYPKSSSECLYTIELEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEVPCPYDIKIKVGPVGLGFFCGEKAPPEPIS	
MASP1_Achain	.....	
MASP3_Achain	.....	
MASP2_Achain	.SAL..GQV....S.ELS..EY.R...L.S.T.S.S.....S.I.D.VES..V.I.....IL.....FL..QIDREER.....KIL.HR.E.	
		360
271	QSHSVLILFHSNDNGENRGWRLSYRAAGNECFEELQPPVHGKIPESQAKYFFKDQVLVSCDIGYKVLKINVENMDTFOIECLKDGTWSNKIP	
MASP1_Achain	.....	
MASP3_Achain	.....	
MASP2_Achain	K.NT.T.T.VT.E..DHT..KIH.TSTAQP..YPM.A.PN.HVS.V...IL..SFSIF.E...EL.QCHLPLKS.TAV.Q...S.DRPM.	
		448
361	TKIIVDCRAPGELEHGLITFSTRNLLTYKSEIKYSCOEPYKRNINNTIGITCSAOGVWMIKVLGRSLPICI	
MASP1_Achain	.....	
MASP3_Achain	.....	
MASP2_Achain	A.S....GP.IDD.PS.RVEYI.GPGV....AV.Q...E.TF.T.KV.D-,K.V.E.D.F.TSSKGEK...V,E,,,,SARTTGG	

FIGURA 5

**Alineación de los dominios de la serina proteasa de la MASP (cadenas B)**

```

1          90
MASP1_Echain RIENRPAQKGTTFWIAM_SHLNQP-----FCGSLGSSWIVTAAHCLHQSLDPEDPTLRDSDLSPSDFKIIICKHNRLRSDENEQ
MASP2_Echain  .YG.QK.KF.DE..QVLIILGGTTA-----A.A..YDN.VL...AVYEQ--KH.ASAL.---I-RMGILKR.SP.Y-TQAWSEAV
MASP3_Echain  .IG.N.EP.LE..Q.LIVVEDTSRVNDKW.GS.A..S.A...L...V.RSQ--RE.T.VIP---V.KEHVTYV.,L.D-V.DKSGAV

91          180
MASP1_Echain HLGVKHITLHPQYDNTFENDVALVELLESFVNAFVMPICLP-----EGPQEGAMVIVSGMKQFLQR-----FPETLMEIE
MASP2_Echain  -----FIHEGYTHDAG.D..I..IK.NNKV.I.SNIT.....RKEA.SFNRTDDIGTA....LTQRF-----LARM..YVD
MASP3_Echain  NSSARW...DENIQNYNH.I..Q.Q.PVE.GPH...V,,,RLEP.,-PAPHMLGL.A.,,ISNPNVTVEIISGGRTLSDV.QYVK

181          270
MASP1_Echain  IPIVDHSTCCKAYAPL---LKKVTRONICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVILNREERGQWLVGTIVSWG--DCCGKDRYGVYSYIHHNKDW
MASP2_Echain  .....OK.TA..EKFPYPRCS..AN.L...LES.....S.F.....AL.F.DS.TER.FVG.I.....SNN...EACQ.....TKVINYIP.
MASP3_Echain  L.V.P.AE.KTS.ESRS-6NYS..EN.F...YYI.....T.L.....AF.IFDDLSQR.VVQ.L.....GPEE...S.QV.....TKVSNYV..

271          288
MASP1_Echain  IQRVTGVRN
MASP2_Echain  .ENISDF
MASP3_Echain  VWEQM.LPQSVVEPQVER
    
```

**FIGURA 6**

**Alineación por pares de los dominios de serina proteasa de la MASP (cadenas B)**

```

1          90
MASP1_Bchain RIFNGRPAQKGTTPWIMLSHLNGQPFQGSLLGSSWIVTAAHCLHQSLEDPEDTLRDSDLLSPDFKIILGKHWRLRSDENEQHLGKWH
MASP2_Bchain  . . YG.QK.KP.DF..QVLLI---.GTTAA.A..YDN.VL...AVTEQ---KH.ASAL.---IFWGLI.RLSPHYTQAW.EAVFI.E.YI.

91          180
MASP1_Bchain  TTLHFQYDENTFENDVALVELLESPVLNAPVMPICLP----EGPOEGANVIVSGWKQFLQRFPELMEIPIVDHSTCQKAVAPL--
MASP2_Bchain  DA-----G.D..I..IK.NNKV.I.SNIT.....RKEA.SFMRIDDIGTA...LITQGF LARN...YVD.....QK.TA..EKPPY

181          260
MASP1_Bchain  -KKVTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPWVTLNREGQWYLVGVSWGD-DCGKKDRYGVSYIHHNKDWIQRVTVGRM
MASP2_Bchain  PRGS..AM.LG...LES...S.R...AL.F.DS.TER.FVG.I...SMN...EAGQ...TKVINYIP..ENISDF

```

**FIGURA 7A**

**Alineación por pares de los dominios de serina proteasa de la MASP (cadenas B)**

```

1
MASP1_Bchain RIFNGRPAOKGTFPWIAML-----SHL-NGQPF CGSLLGSSWIVTAHCLHOSLDPEPTLRDSDLSPSDFKILGKHWRLRSDENEQ 90
MASP3_Bchain ..IG..N.EP.LF..Q.LIVVEDT.RVP.DKW.CS.A..SA...L...V.RSQR--R.T.VIP----V.KEHVTYV..L.-DV.DKSCAV

91
MASP1_Bchain HLGVKHTTLHPQYDPNTEFNDVALVELLESPVINA FVMPICLPEGPOEQA---MVIVSGWG-----KQFLORFPETLMEIEI 180
MASP3_Bchain NSSARWV..DFNIQNYNH.I..Q.Q.PVP.GPR...V...RLEPEGP.PHMLGL.A...ISNPNTVDEIILSSGTRILSDV.QYVKL

181
MASP1_Bchain FIVDRHSTCGKAYAPLKKK--VTRDMICAGEKEGKDACAGDSGGPMVTLNRERGQWTLVGTYSWG--DDCGKADRYGVYSYIHHNKDWIQ 270
MASP3_Bchain .V.P.AE.KTS.ESRSGNYS..EN.F...Y...T.L...AF.IFDDLSQR.VVQ.L...GPEE..S.QV...TKVSNYV..VW

271 286
MASP1_Bchain RVTGVRN
MASP3_Bchain EQM.LPQSVVEPQVER

```

**FIGURA 7B**



Supervivencia después de la infección con el serogrupo A Z2491 del *N. meningitidis*

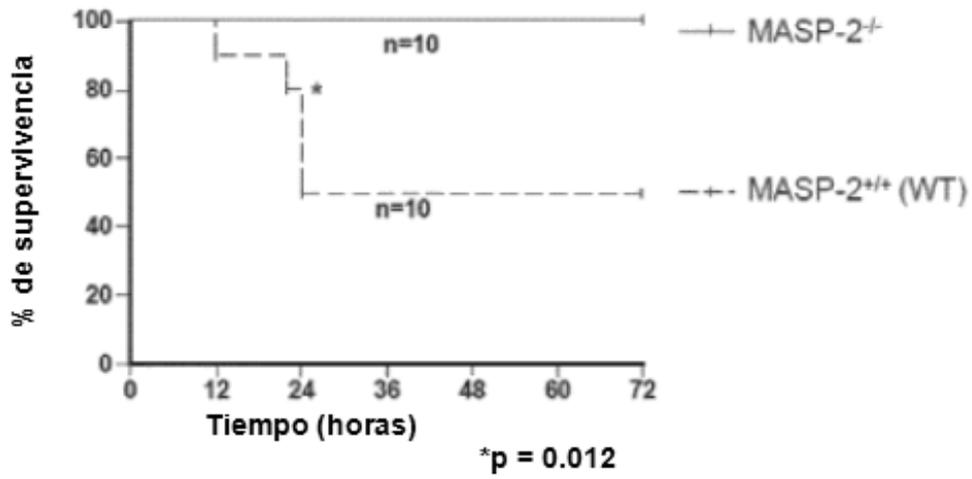


FIGURA 8

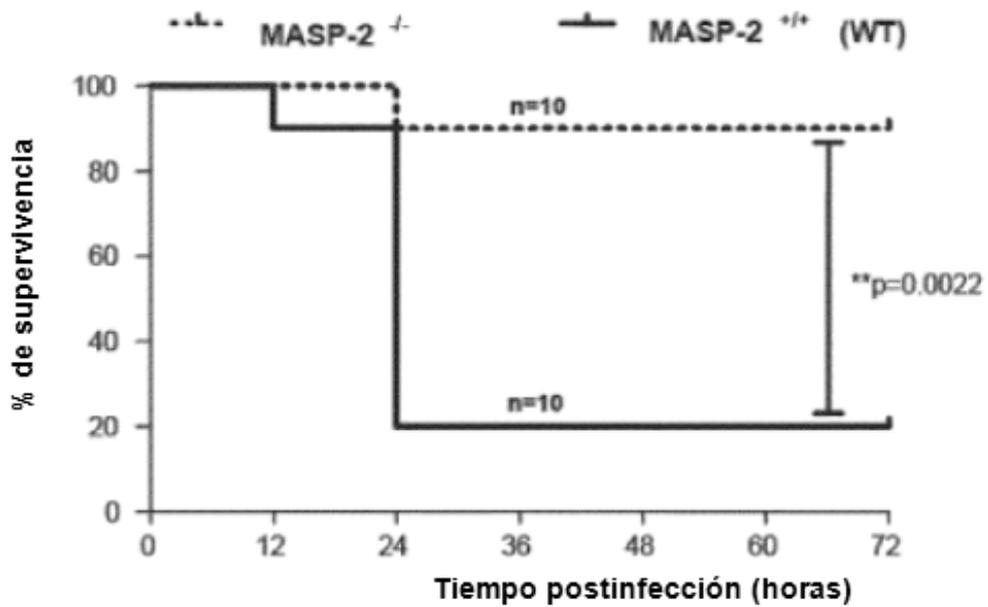


FIGURA 9

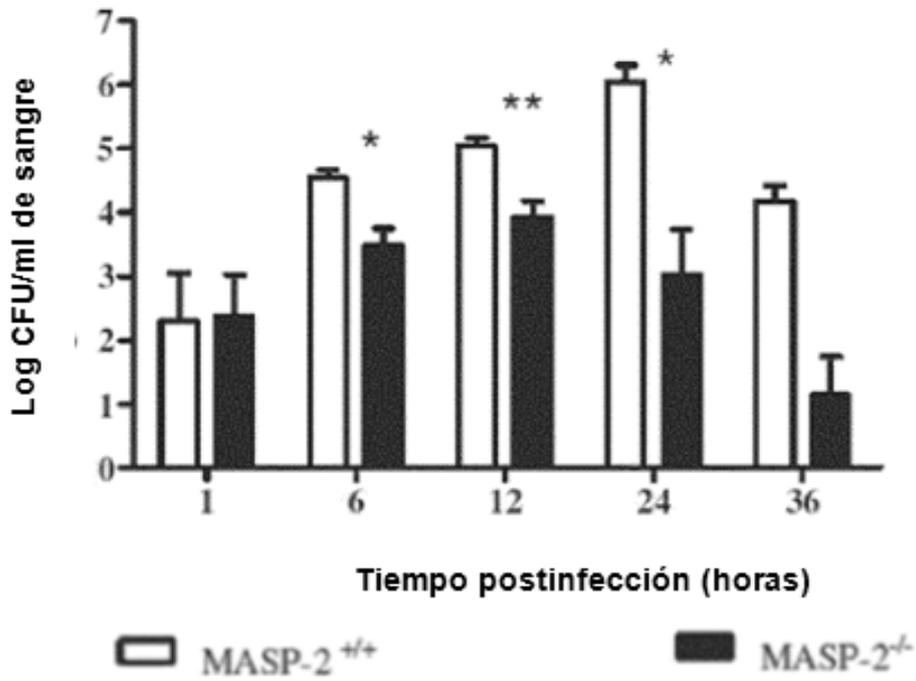


FIGURA 10

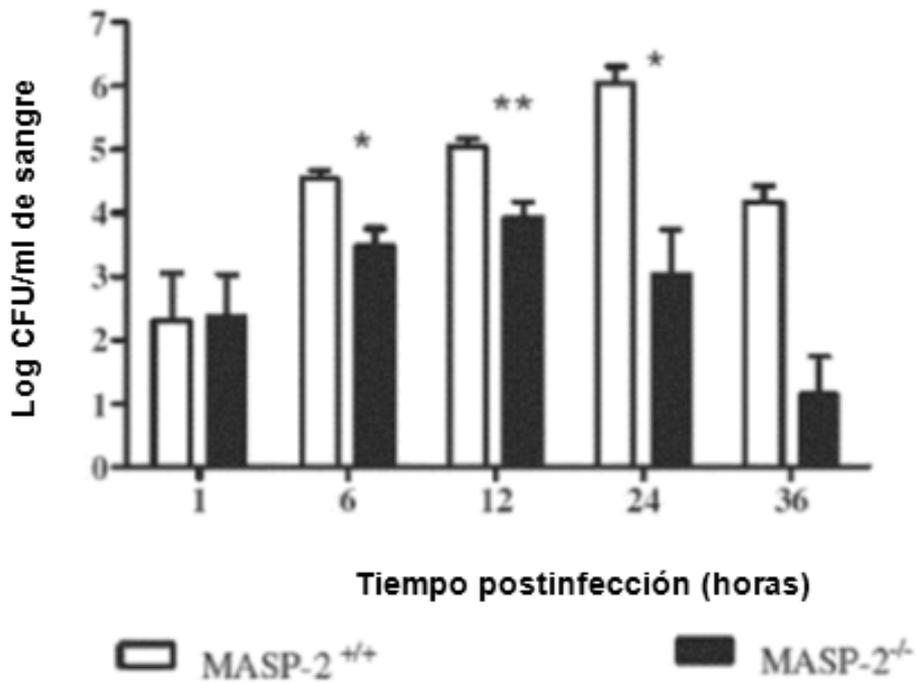


FIGURA 11

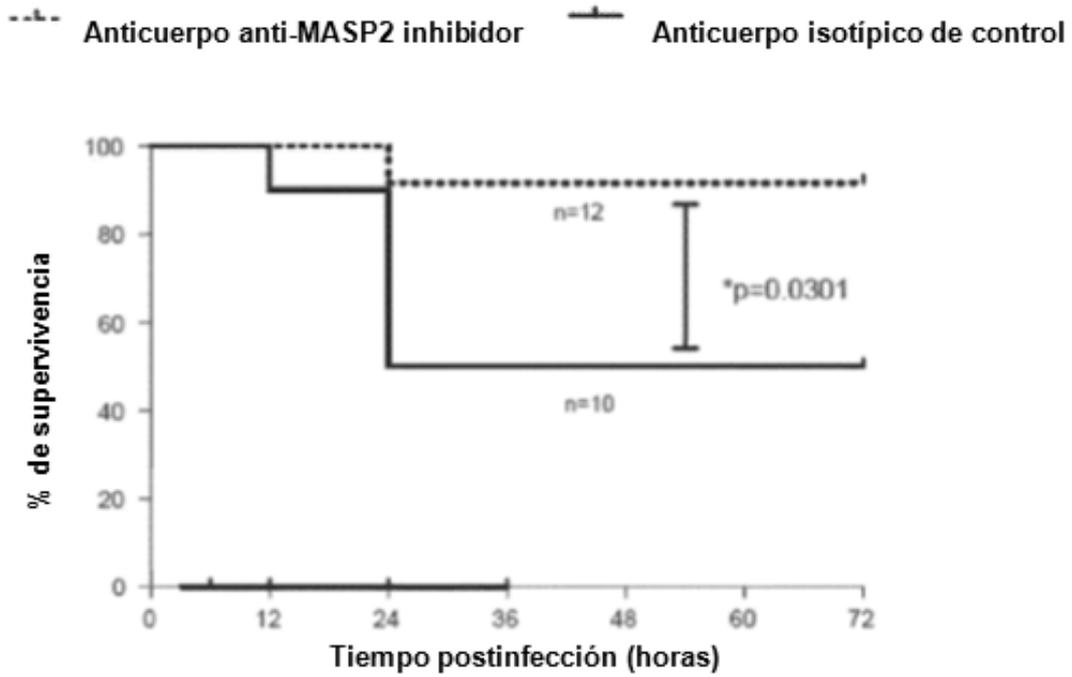


FIGURA 12

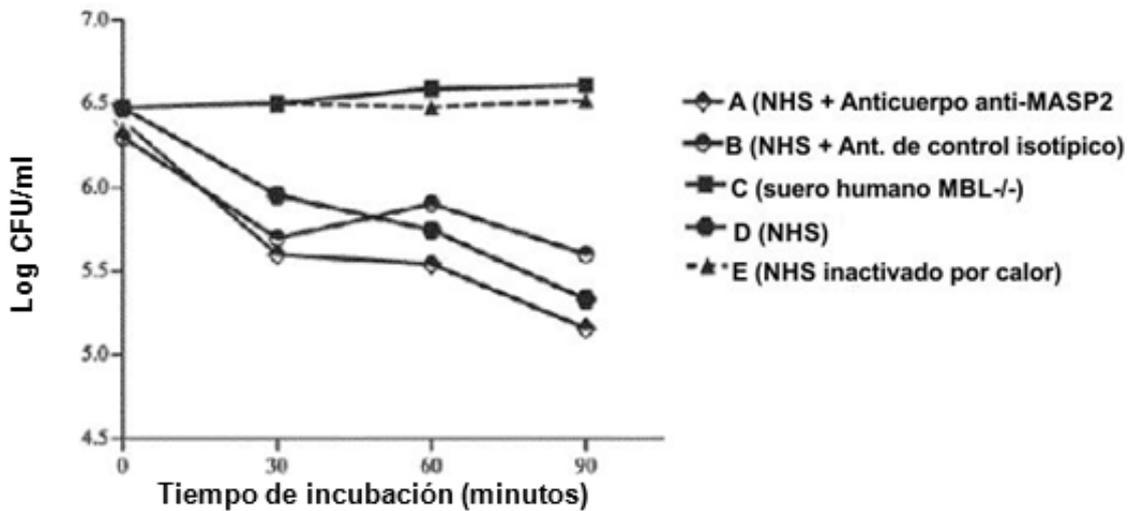


FIGURA 13

Exterminio dependiente del complemento del *Neisseria meningitidis*, en suero humano 20 % v/v

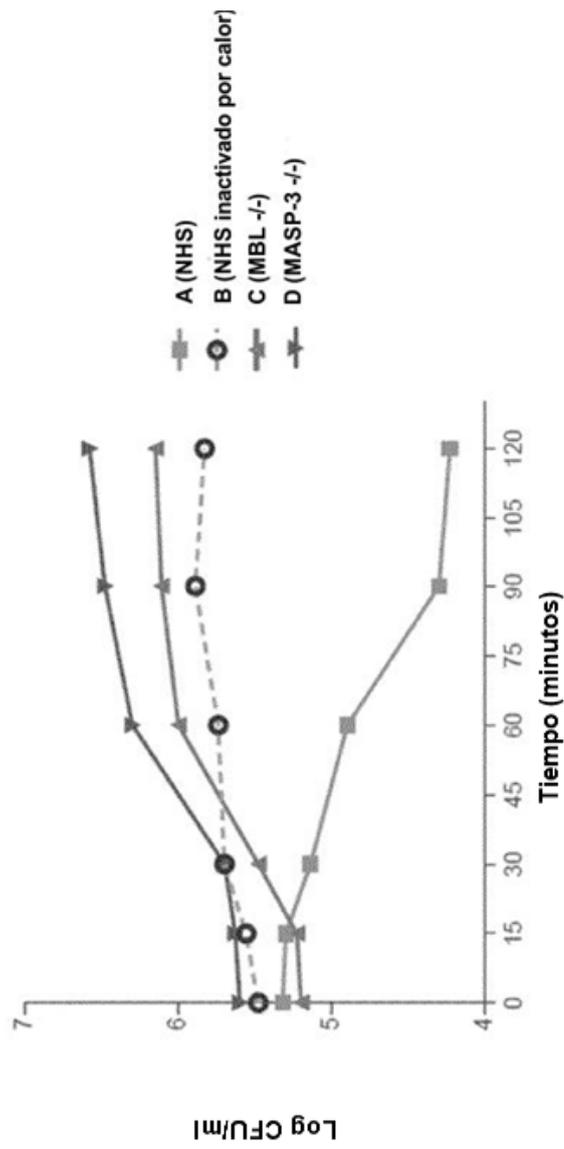


FIGURA 14

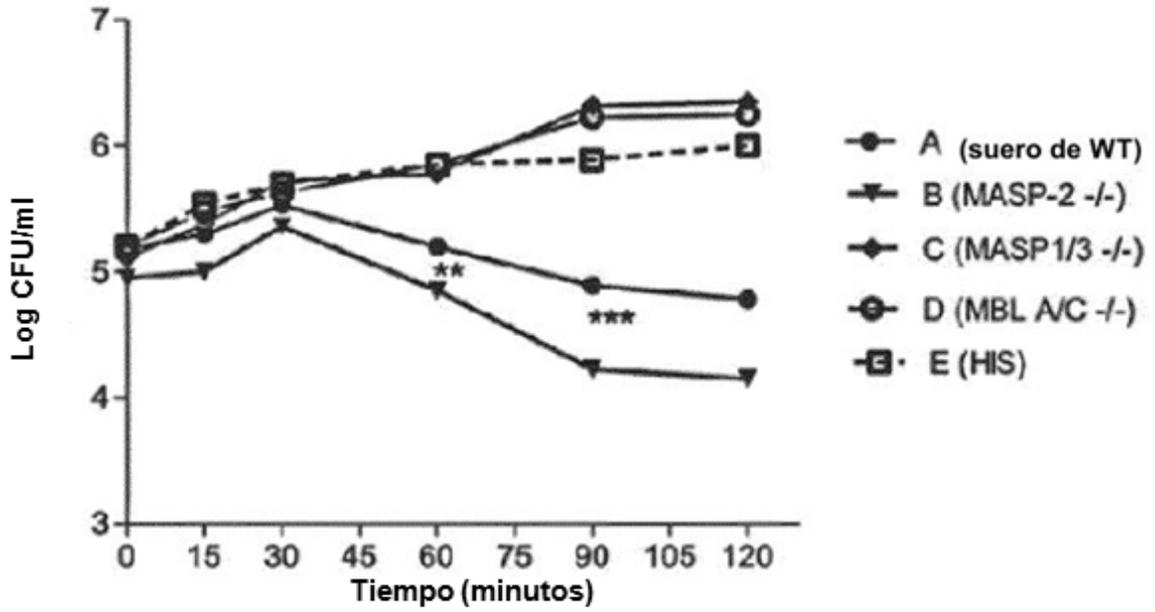


FIGURA 15

Los ratones con deficiencia en MASP-1/3 no presentan deficiencias en la actividad funcional de la LP

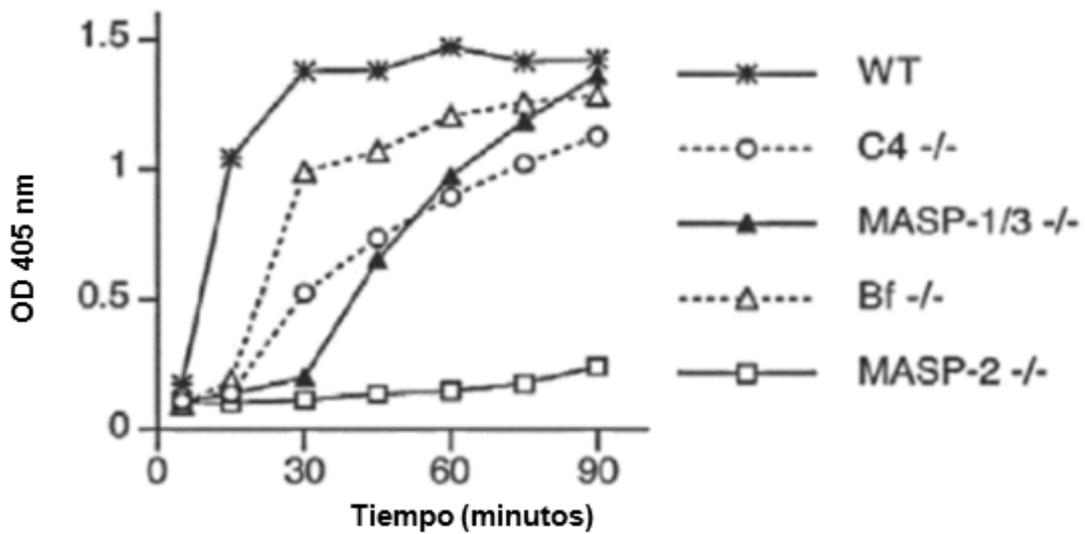


FIGURA 16

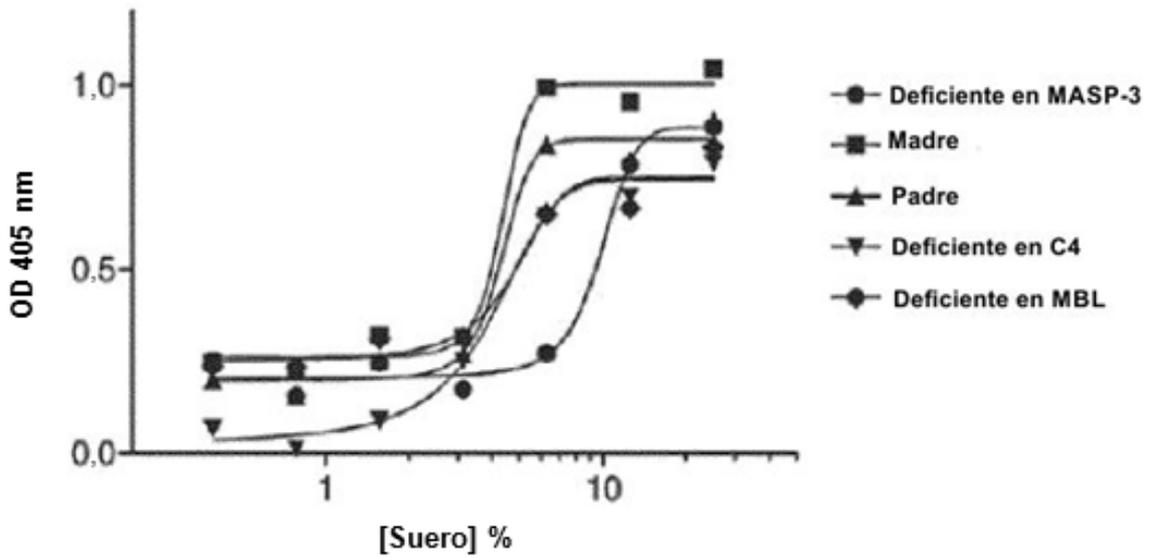


FIGURA 17

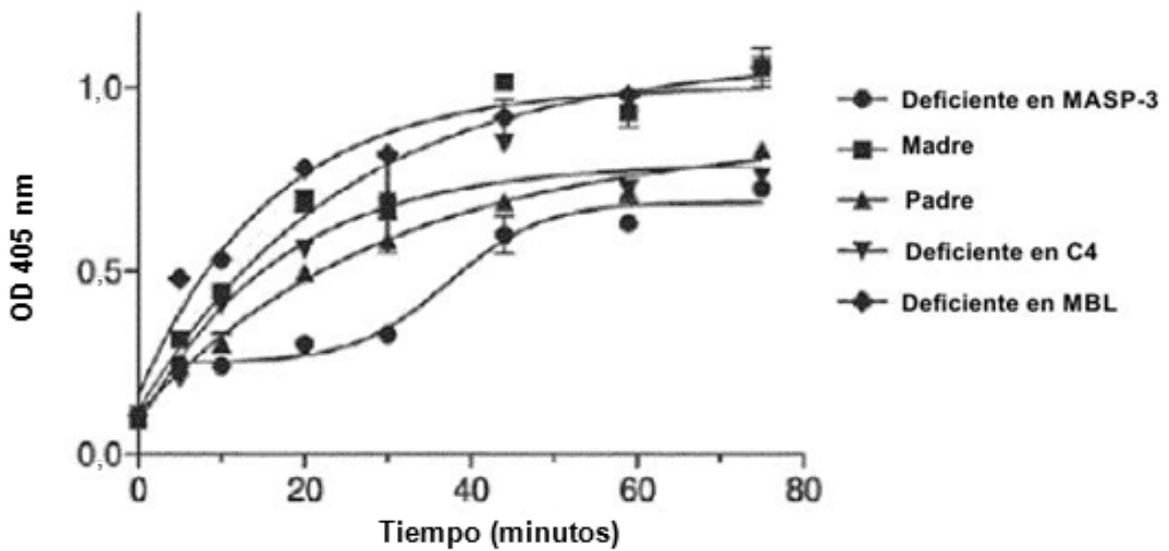


FIGURA 18

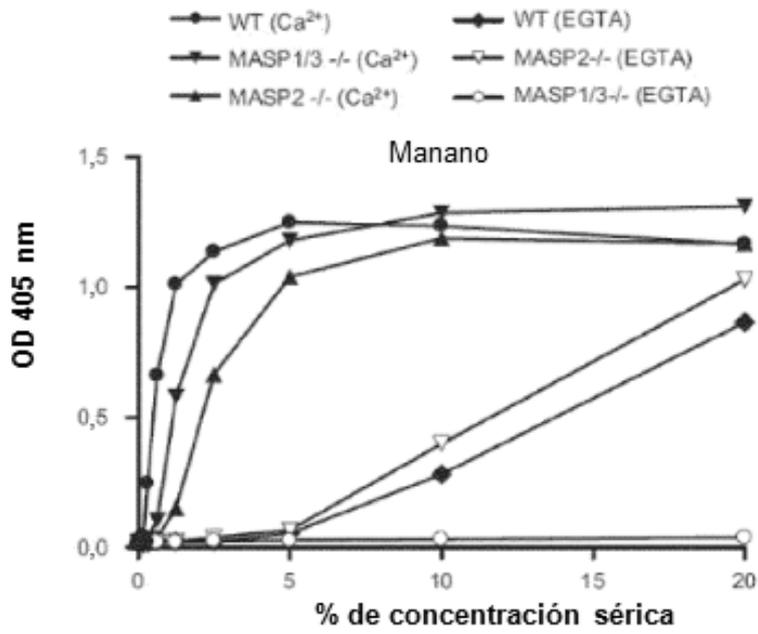


FIGURA 19A

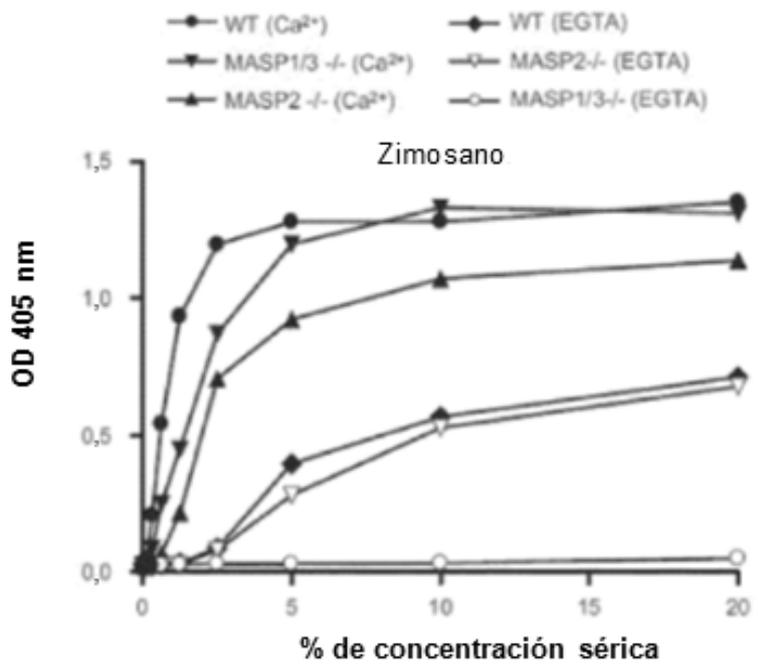


FIGURA 19B

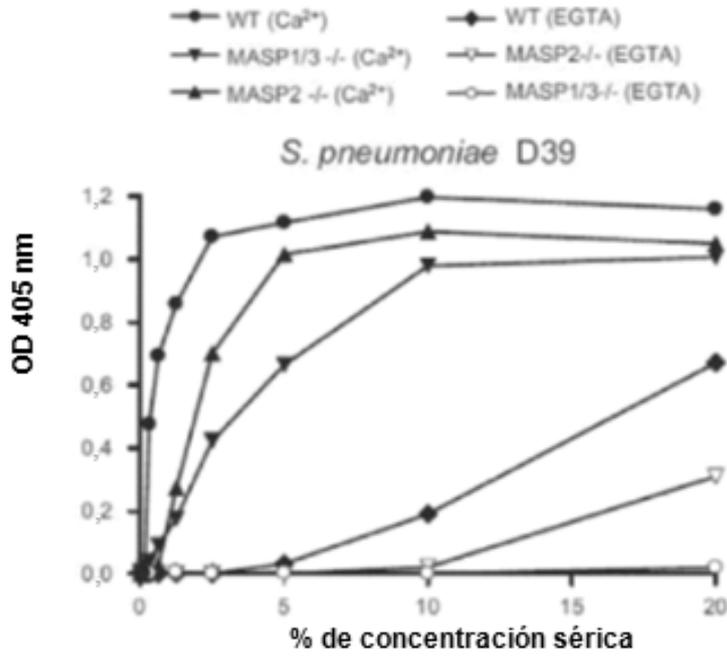


FIGURA 19C

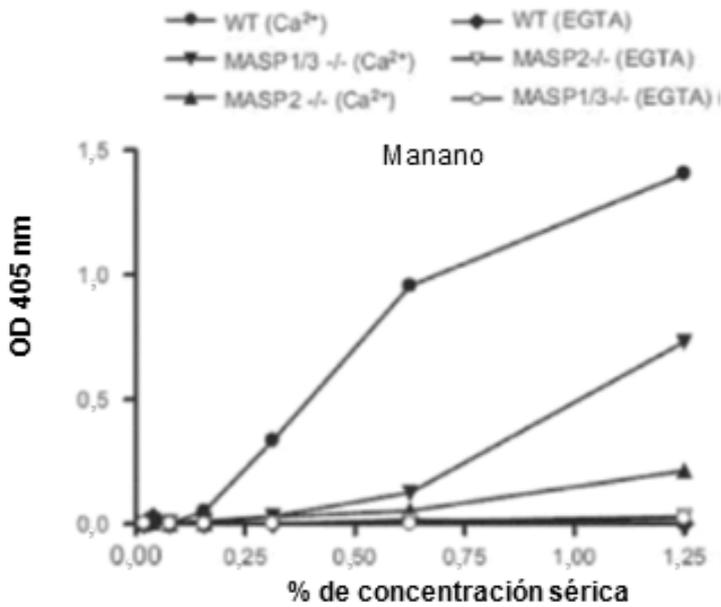
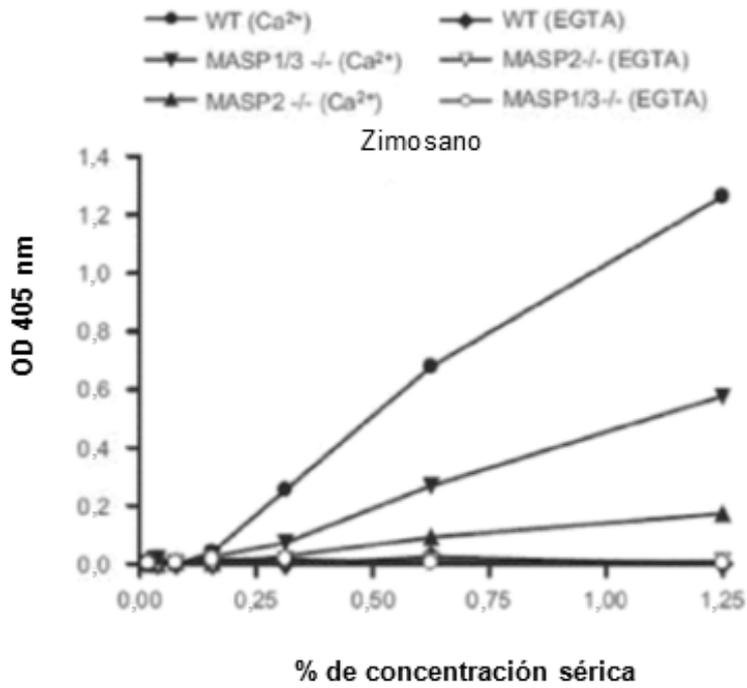
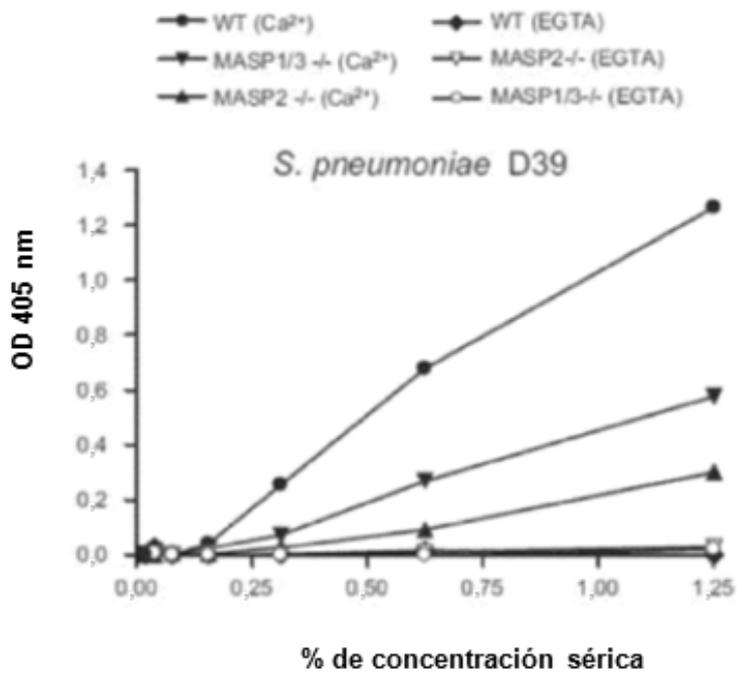


FIGURA 20A



**FIGURA 20B**



**FIGURA 20C**

Hemólisis de los RBC murinos recubiertos con manano por el suero humano

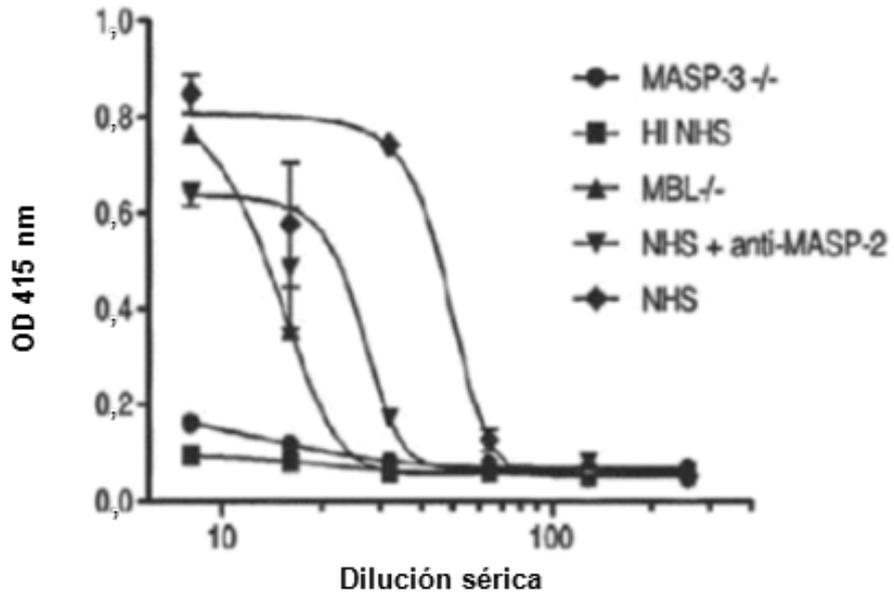


FIGURA 21

Hemólisis de los RBC murinos recubiertos con manano por el suero humano

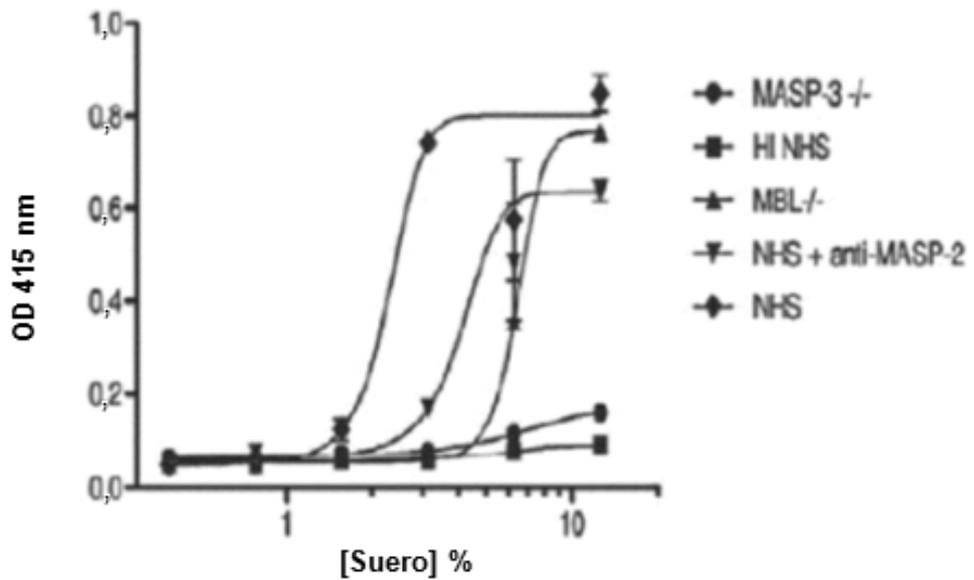


FIGURA 22

Hemólisis de los RBC murinos de WT por el suero humano

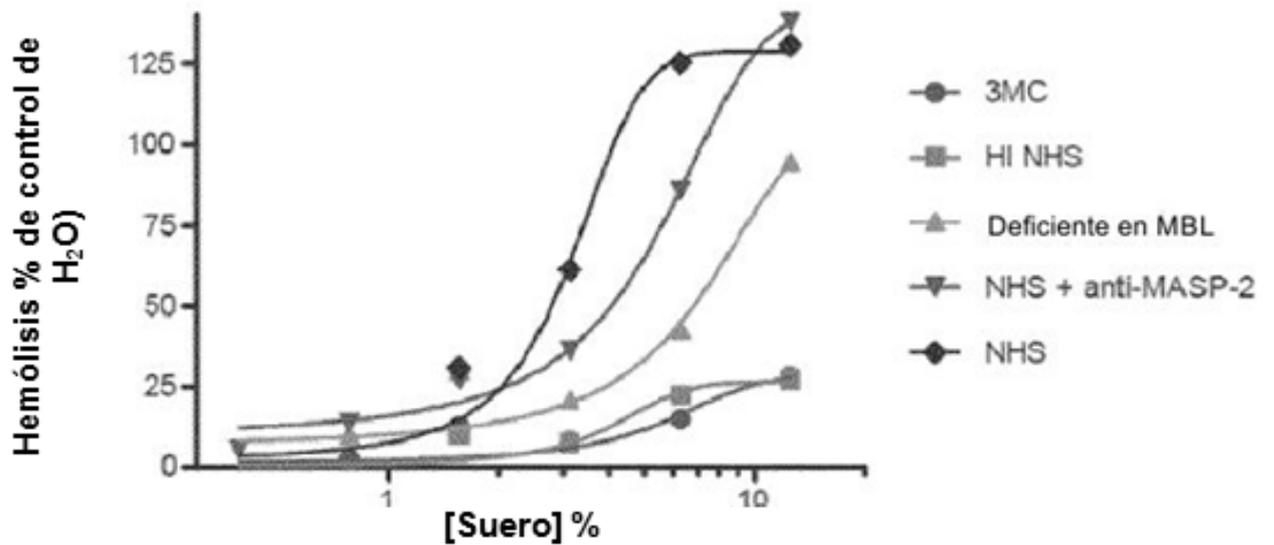


FIGURA 23

Hemólisis de los RBC murinos CD55/59 -/- por el suero humano

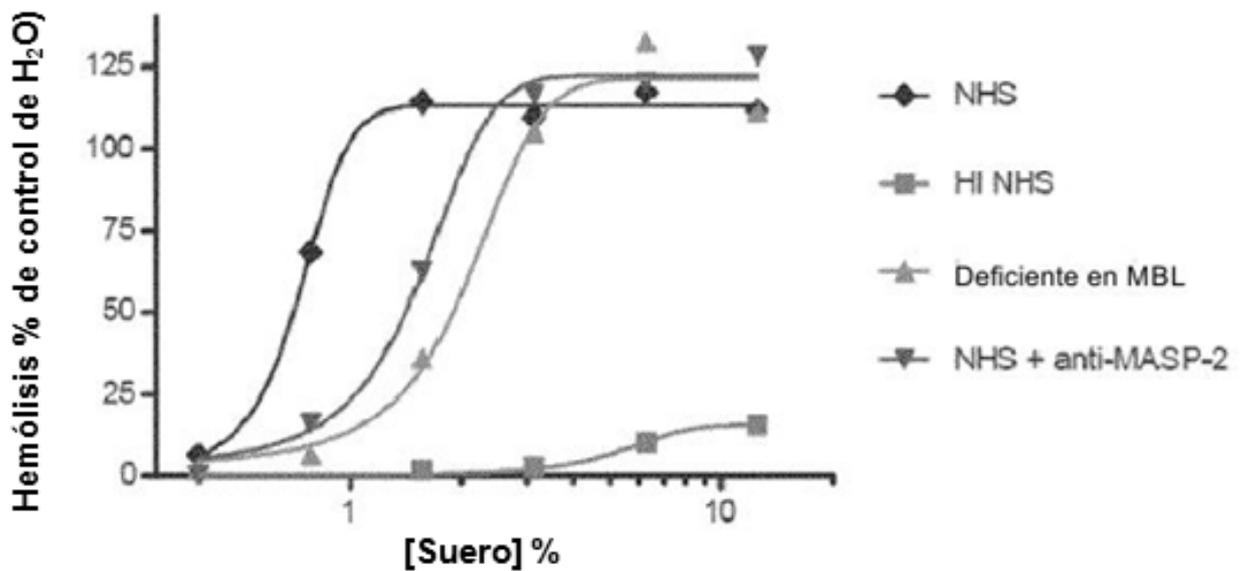


FIGURA 24

Ensayo hemolítico que utiliza RBC de conejo con sueros de ratón WT y MASP-1/3 <sup>-/-</sup>.

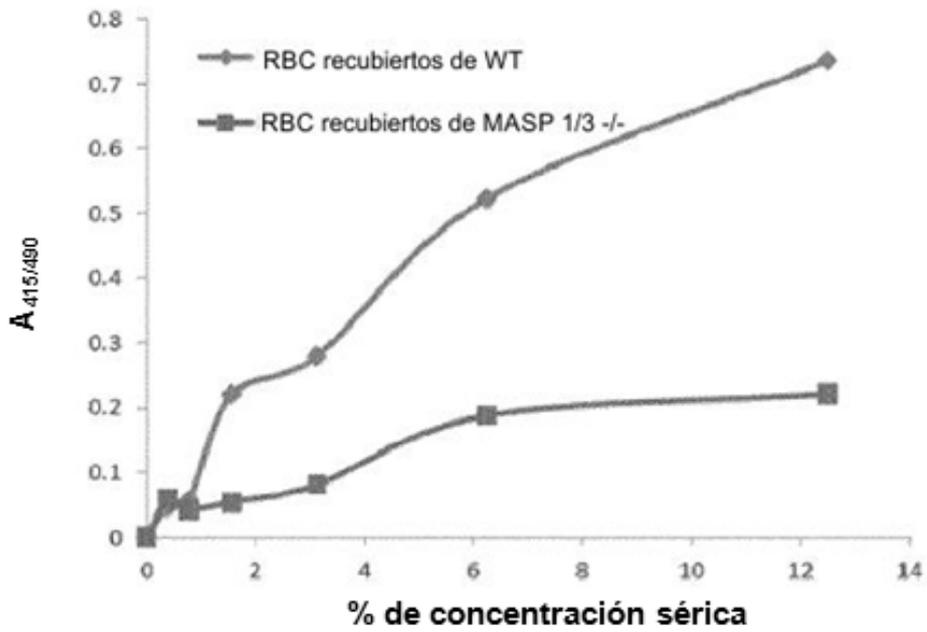


FIGURA 25

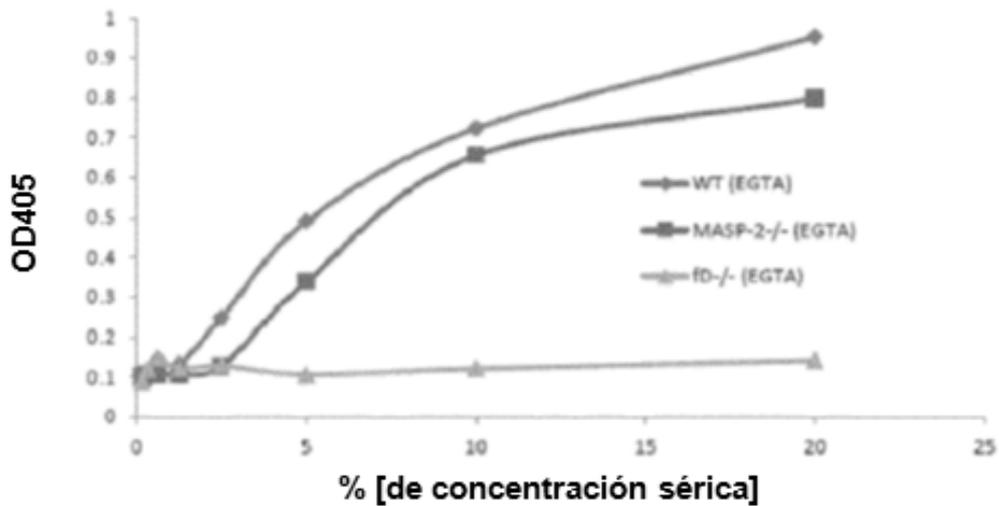


FIGURA 26

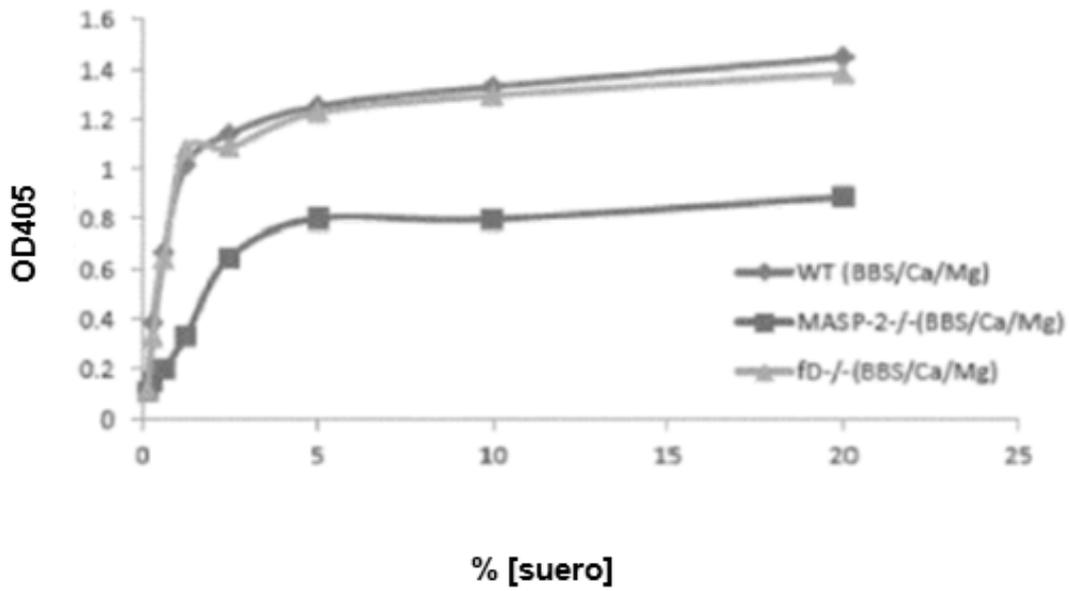


FIGURA 27

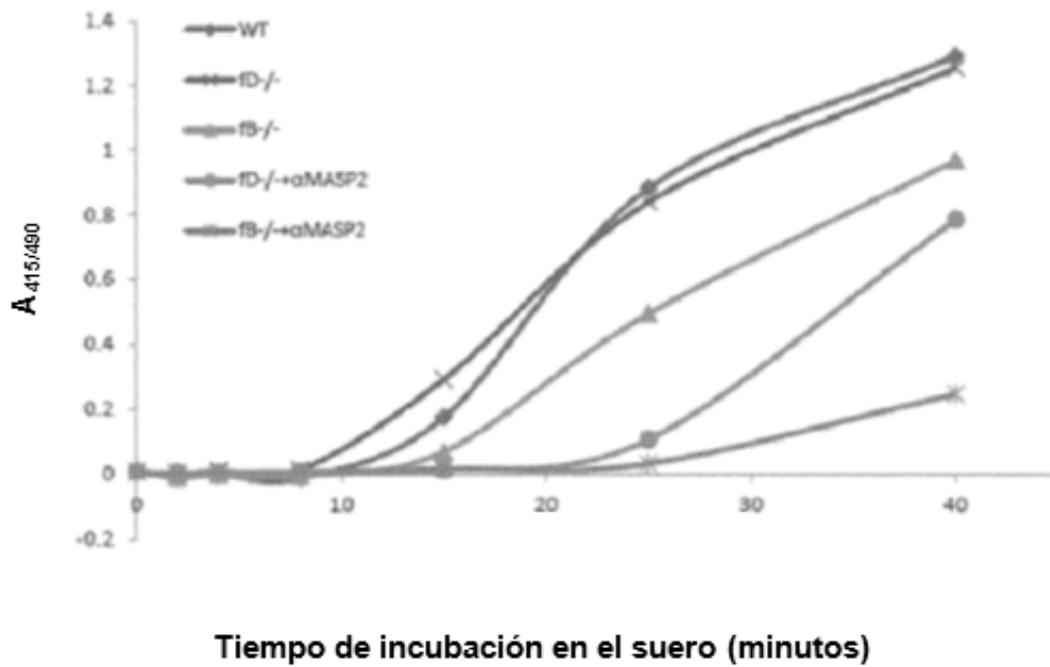
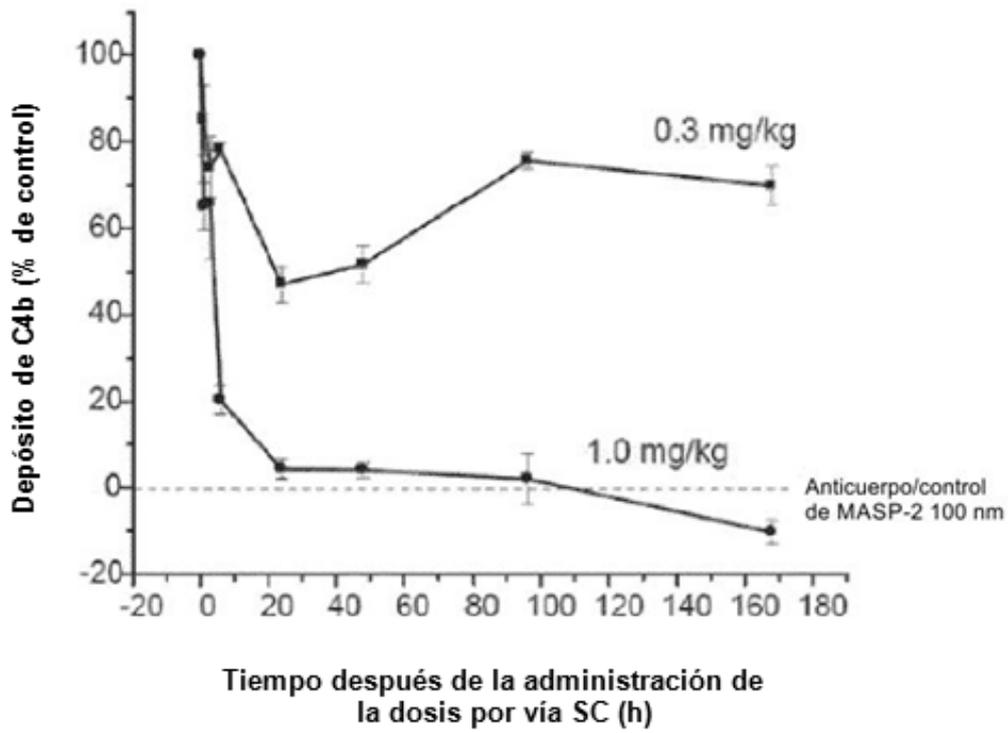


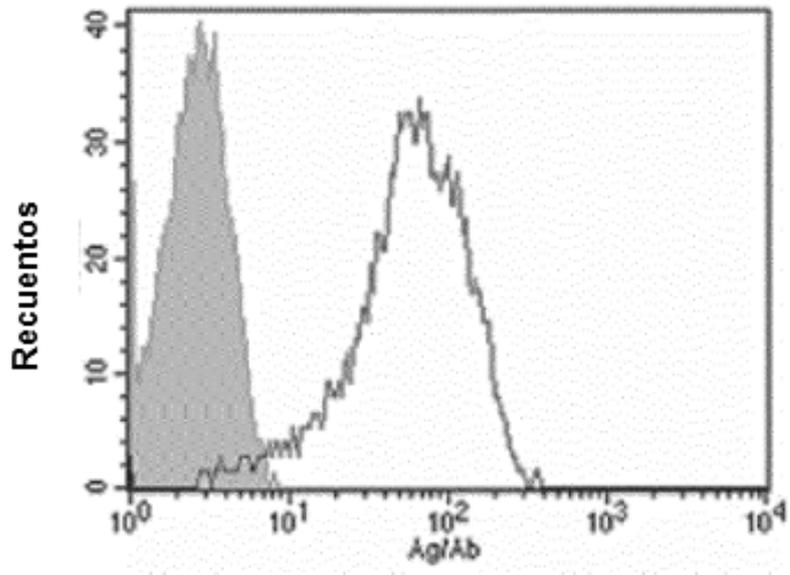
FIGURA 28



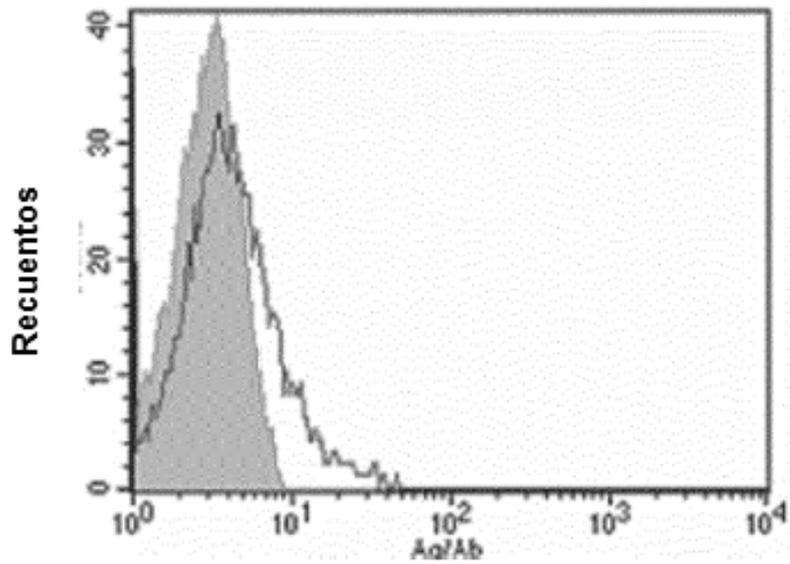
**FIGURA 29A**



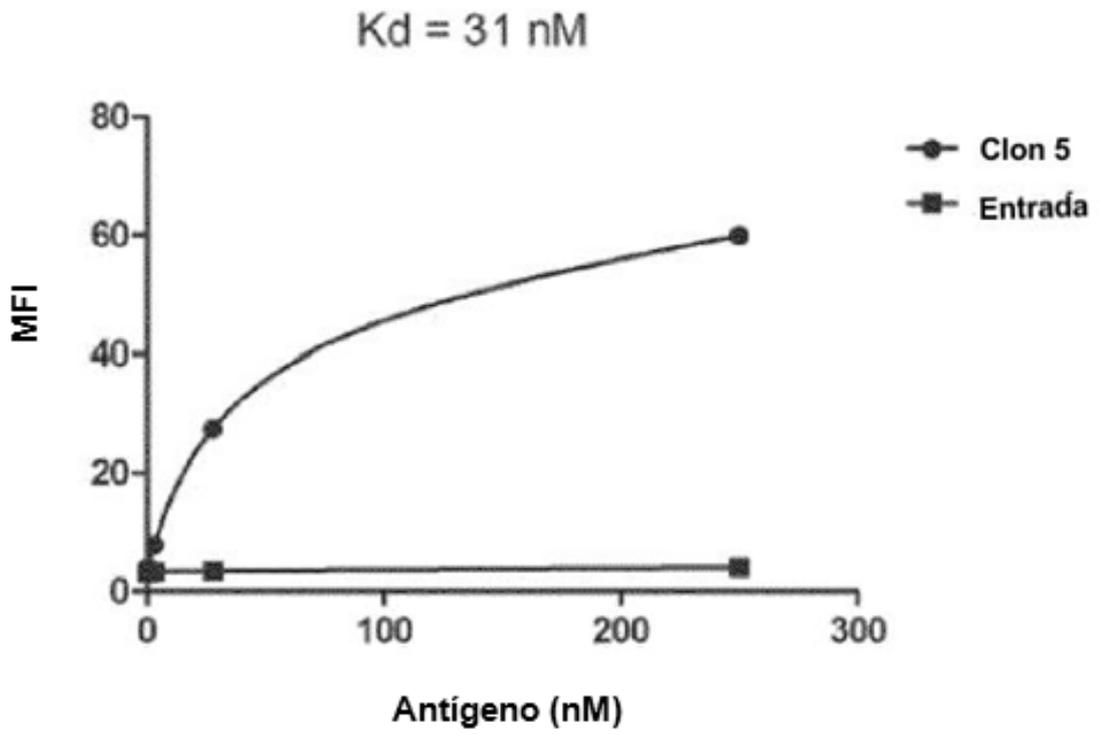
**FIGURA 29B**



**FIGURA 30A**



**FIGURA 30B**



**FIGURA 31**

FIGURA 32A

1	VH	AVTLDESGGLQTPGGALS	LVCKASGFTFS	NAMG	MVROAPGKGLEWVA	GID-DDGSGTRYAPAV	65
	M3J5	.....G.....	.....Y.....	Y.....M.....	.....Y.....	.....R-S...F.L..T..	
	M3M1	.....G.....D.....	YQ.N.I.....	Y.Q.N.I.....	.....F.....	.....A.N-RF.NS.GHGA..	
	D14	.....	.....	Y.H.....	.....	.....Y-KS.A..N.....	
	1E10	.....	.....	YD.V.....	.....F.....	.....SRN..RY.E.GS..	
66	VH	KGRATISRDNQSTLR	LQLNLR	RAEDTGTYYCTK	CAYSS-GCDYEGG--	YIDAM	129
	M3J5	.....V.....	.....A..F..	RSG.....	.....NV..--D.....	.....	
	M3M1	.....D...D...V...S...A...A...G.V.GYC.SYSCC.VDT.....	.....	.....	.....	.....	
	D14	.....V.....	.....A...A...TTG.GC	SSG.RAE.....	.....	.....	
	1E10	.....V.....	.....A...ARD.GG..	AYW	FD	...Q.....	

FIGURA 32B

1	VL	ALTQPASVSANLGGTVK	ITCSGGGS	-YAGS	YYYG	WQQKS	PGSAPV	TVI	DNDK	54
	M3J5	.....P.E.....	.....Y.G.....	.....	.....	.....A.....	.....L.....	.....L.....	.....Y.N.....	
	M3M1	.....P.E.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....L.....	.....L.....	.....Y.N.....	
	D14	.....P.E.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....L.....	.....L.....	.....Y.N.....	
	1E10	.....P.E.....	.....	.....	.....	.....A.....	.....L.....	.....L.....	.....Y.N.....	
55	VL	RPSDIPSRFSGLS	SGSTNLT	ITGVRADDEAVYFC	GSADNSGAA	FGAGTTL	TVL	108		
	M3J5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	M3M1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	D14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
	1E10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		

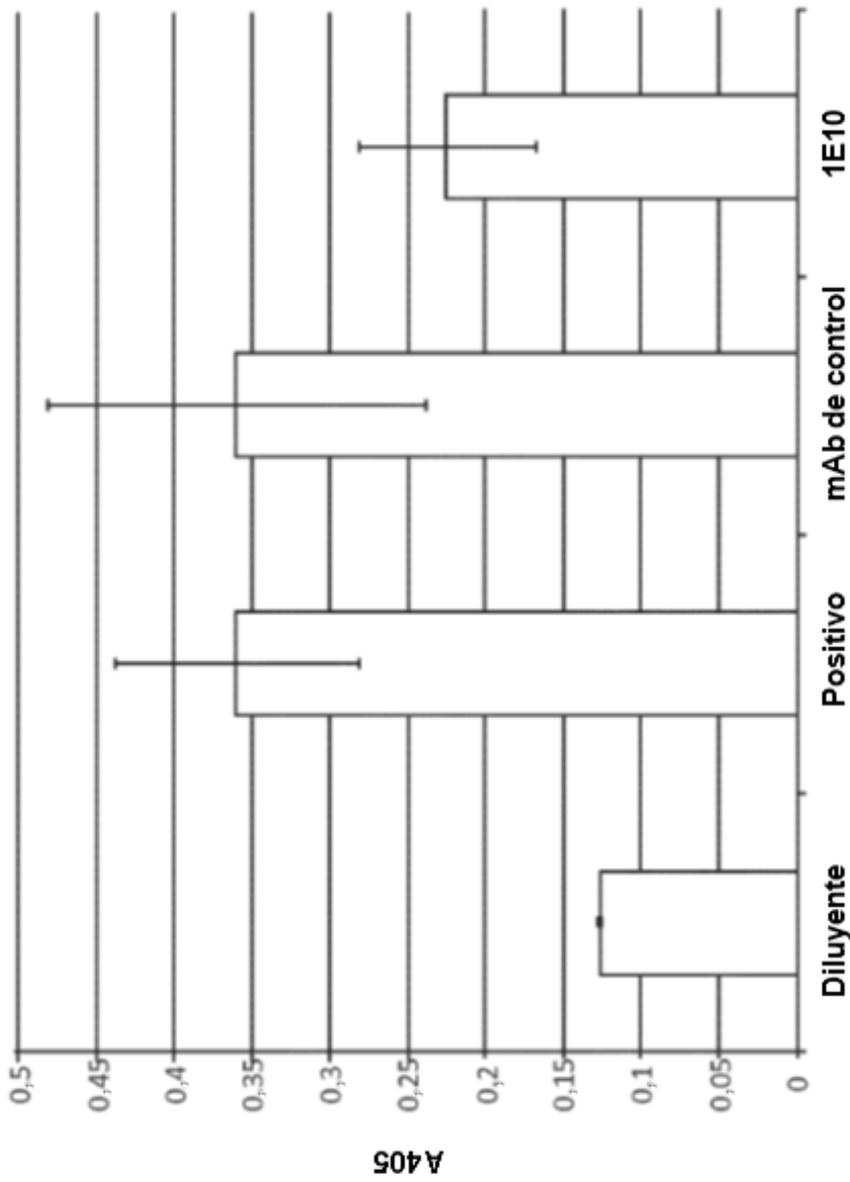


FIGURA 33

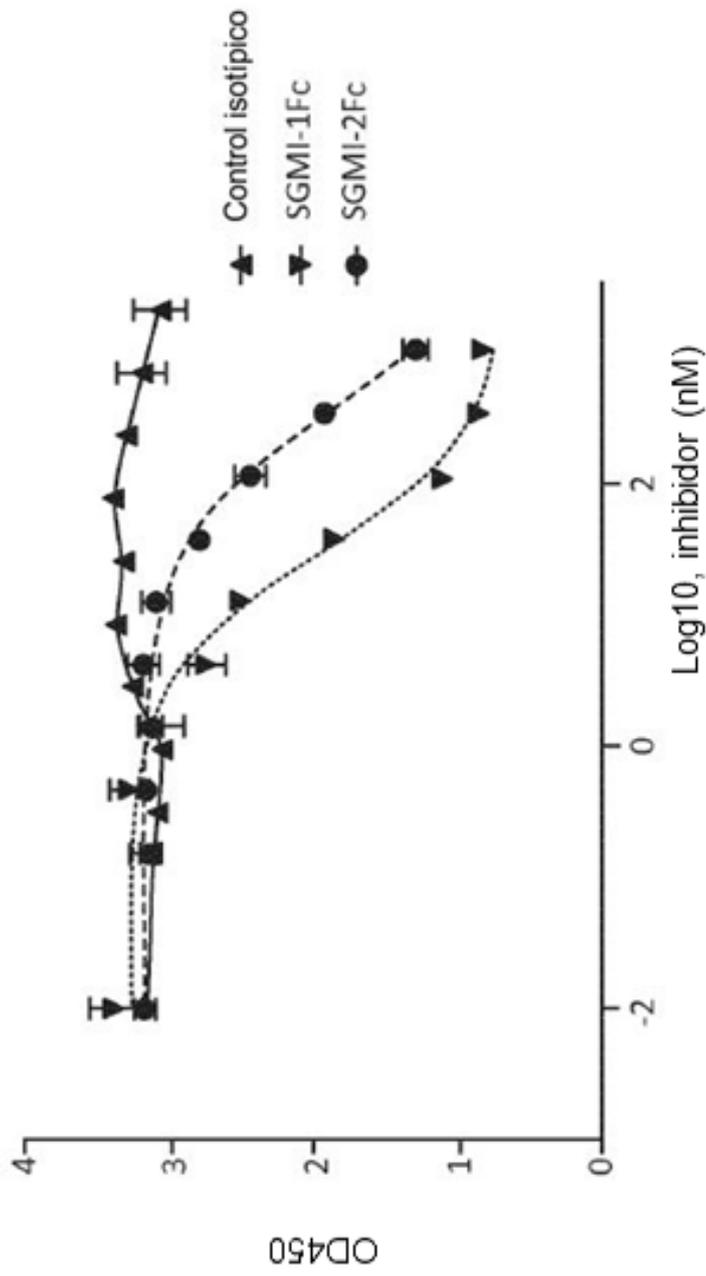


FIGURA 34

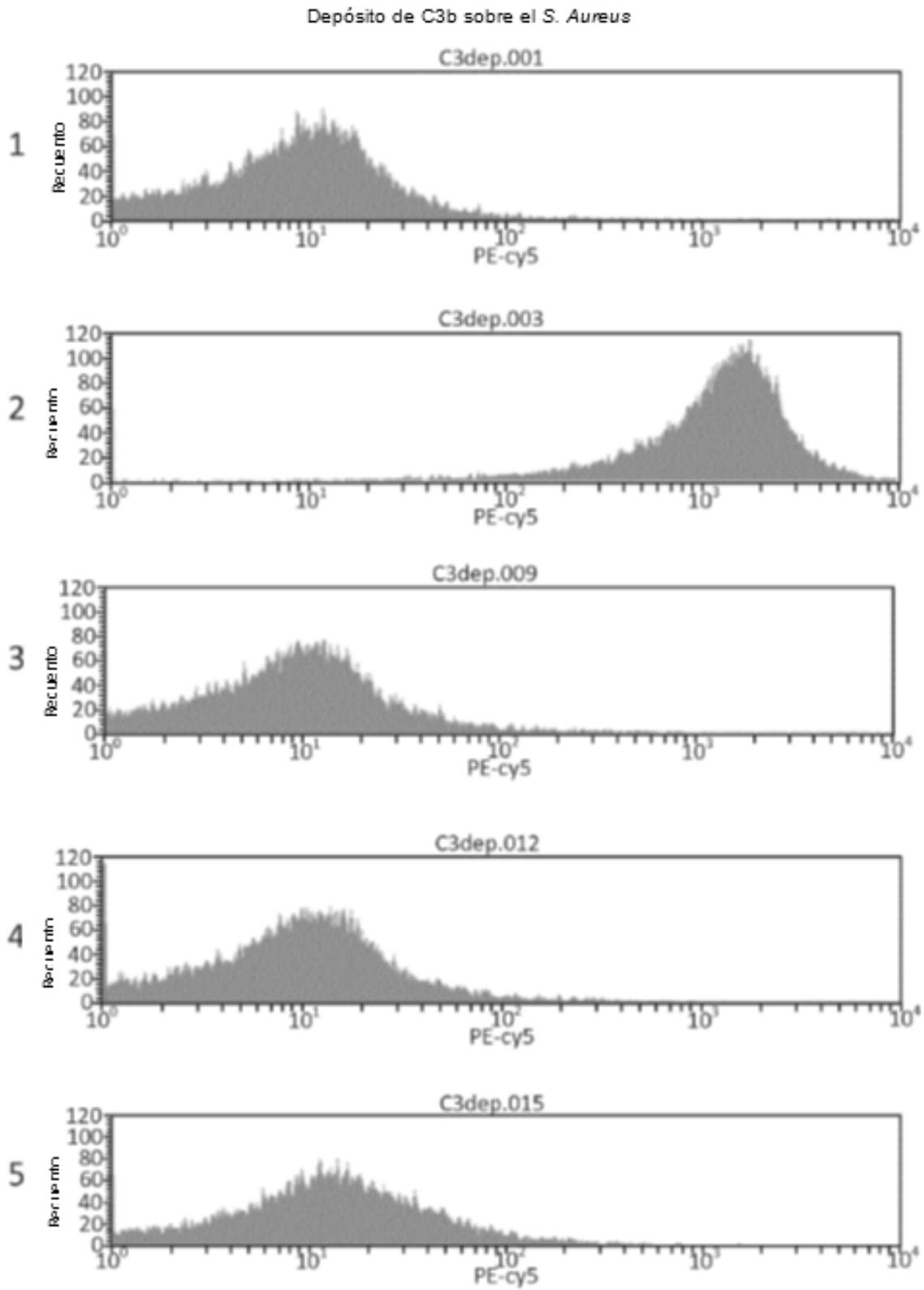


FIGURA 35A

Depósito de C3b sobre el *S. Aureus*

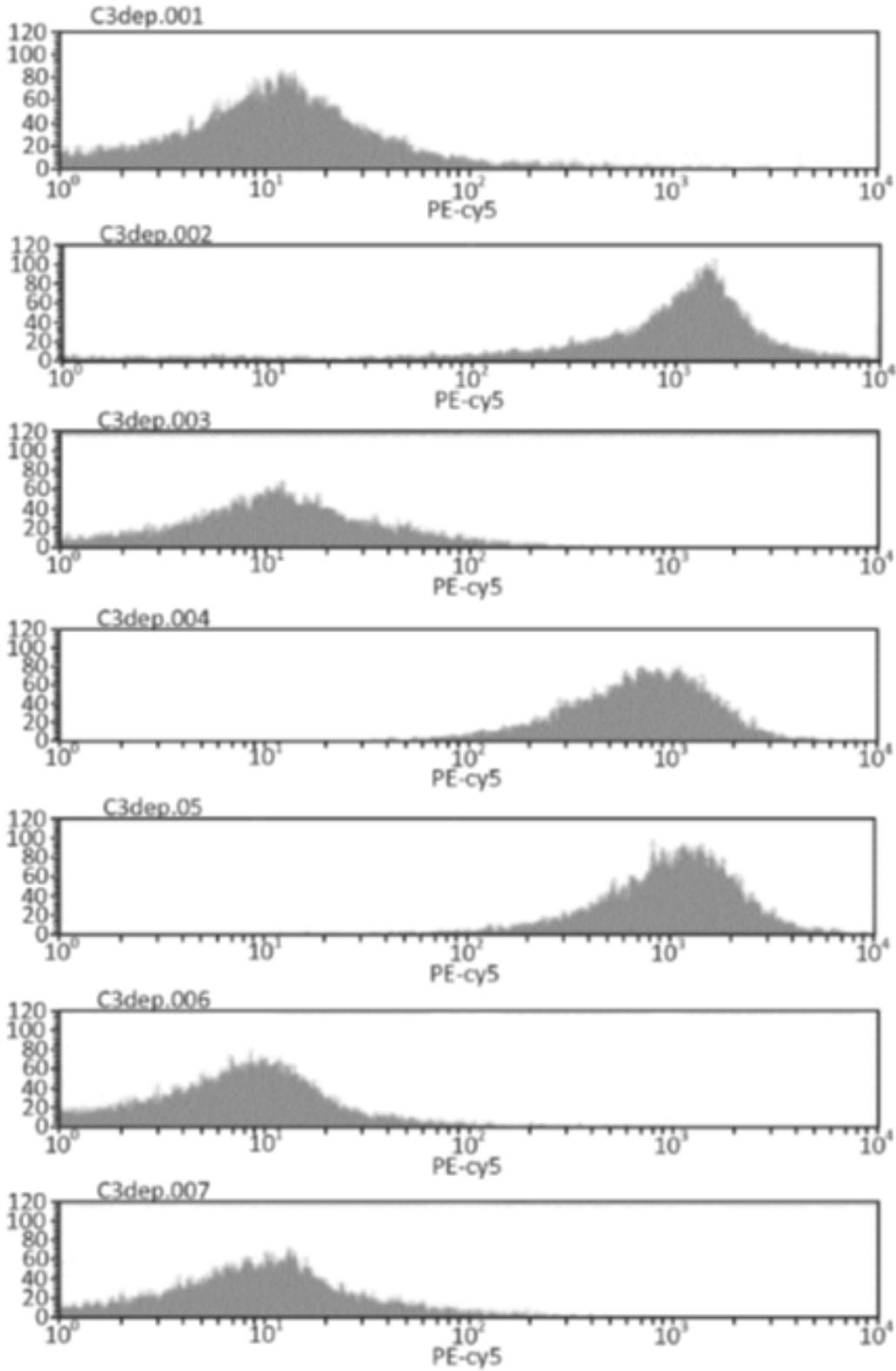
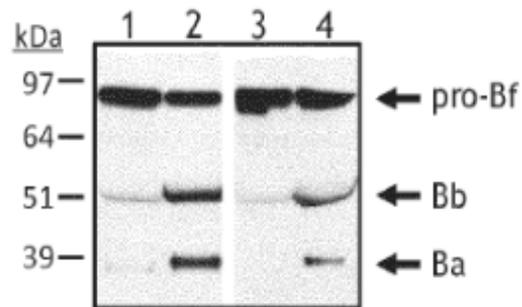


FIGURA 35B

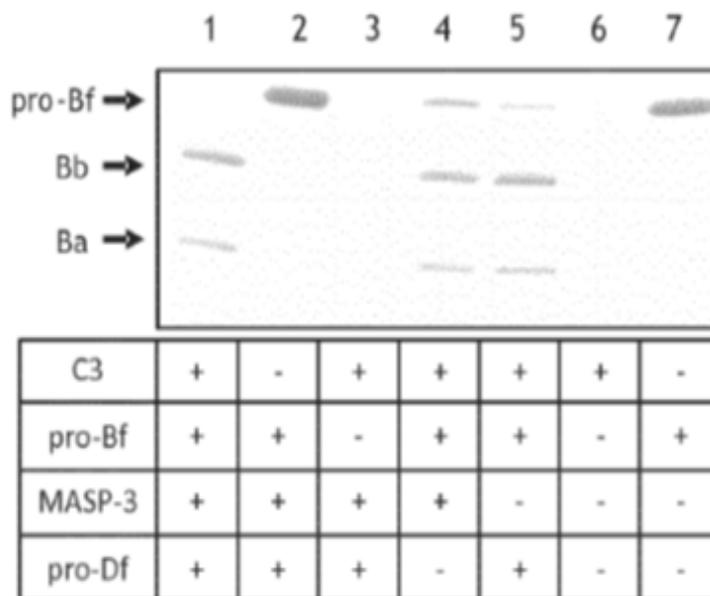
Escisión del factor B en respuesta al *S. aureus*



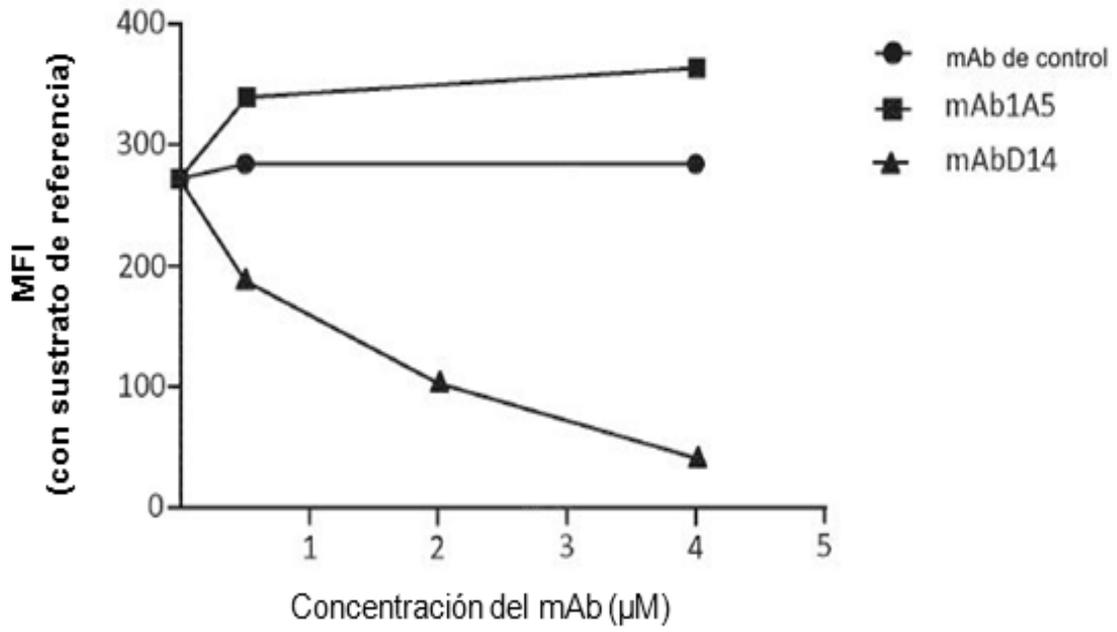
La complementación del suero de un paciente con 3MC con MASP-3 recombinante no aumenta la escisión del factor B.

**FIGURA 36**

La MASP-3 escinde directamente el pro-Bf

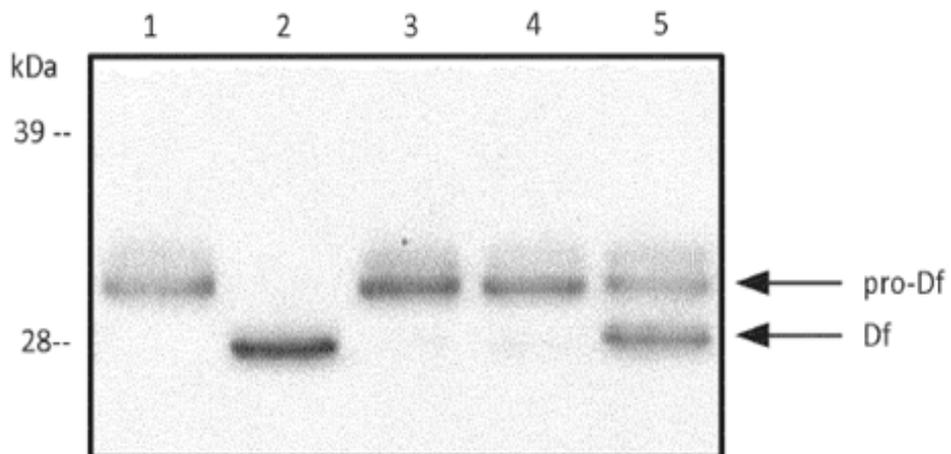


**FIGURA 37**



**FIGURA 38**

La MASP-1 y la MASP-3 activan el pro-Bf



**FIGURA 39**

Inhibición parcial de la escisión del Pro-Df dependiente de la MASP-3, con anticuerpos de la MASP-3

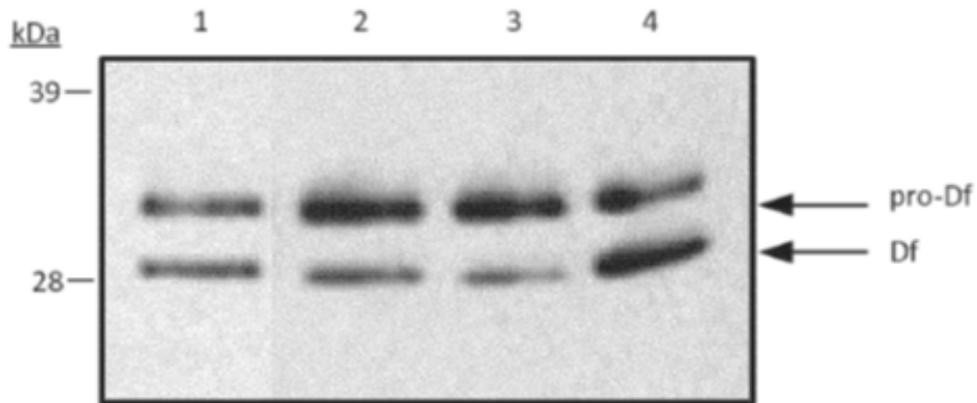


FIGURA 40

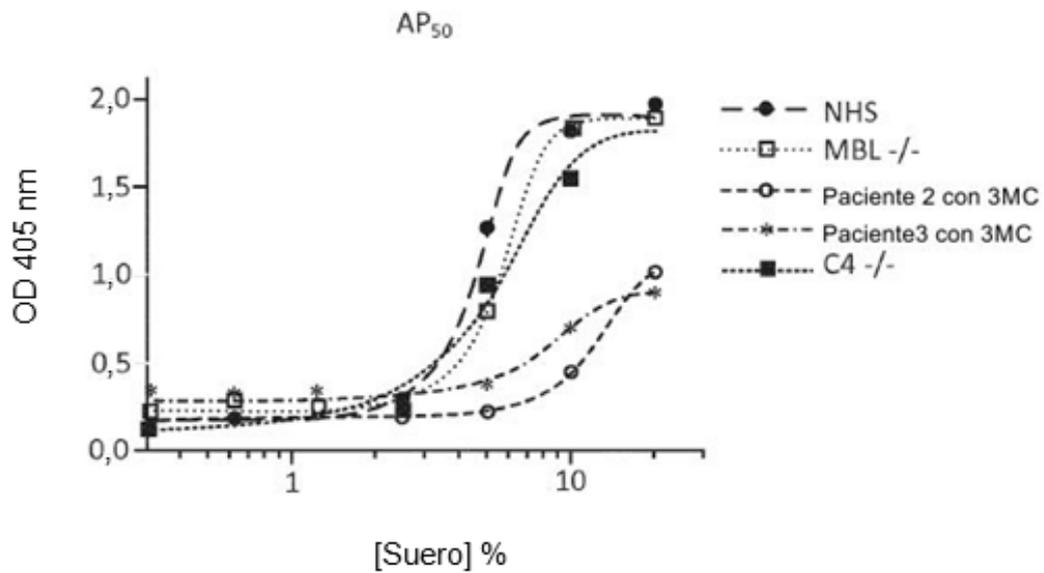


FIGURA 41

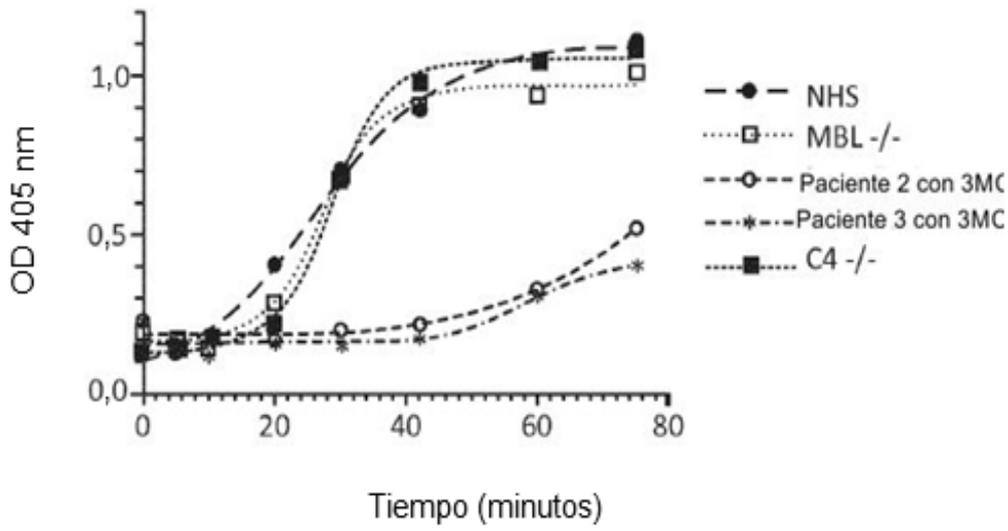


FIGURA 42

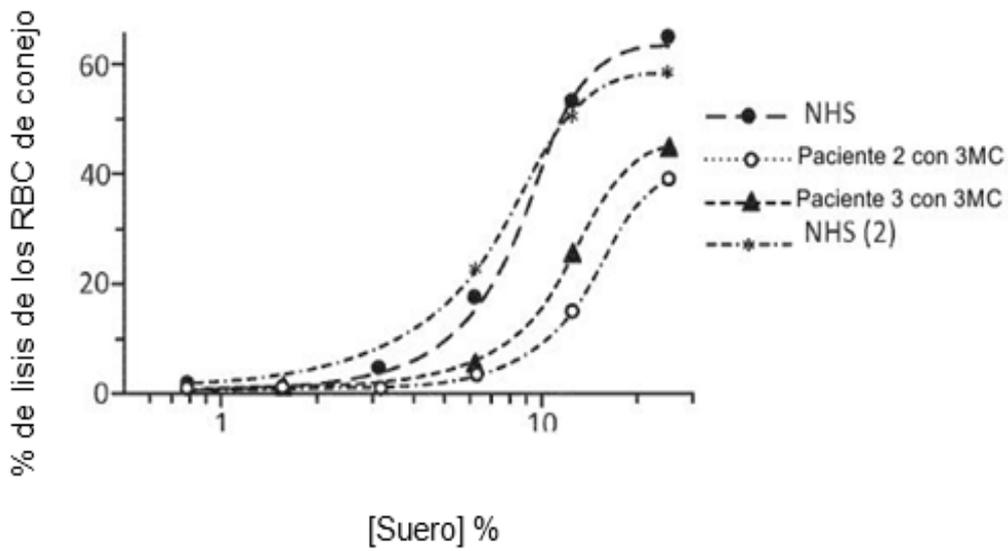


FIGURA 43

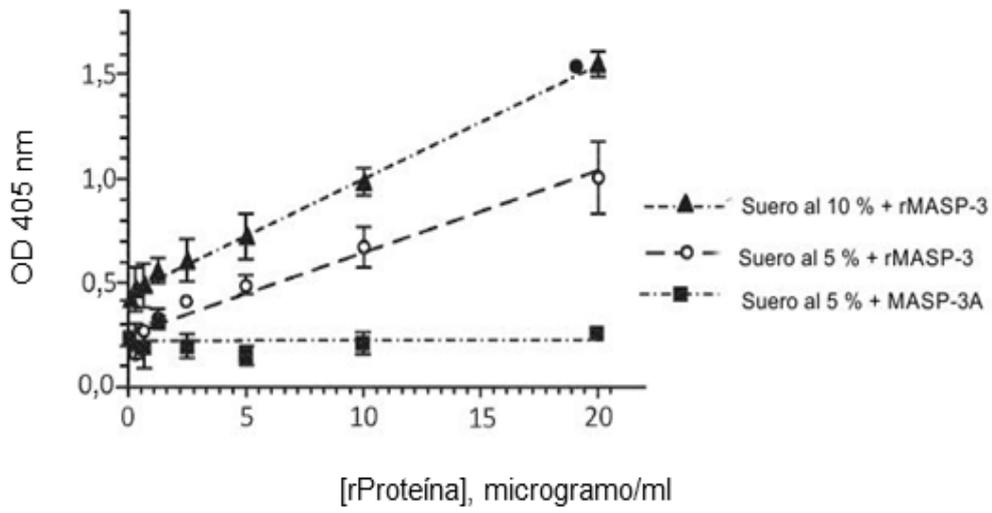


FIGURA 44

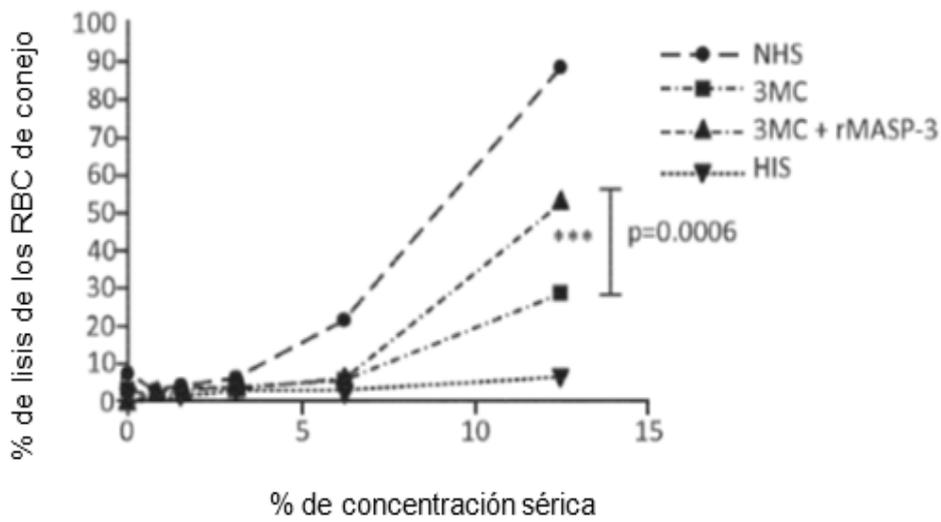
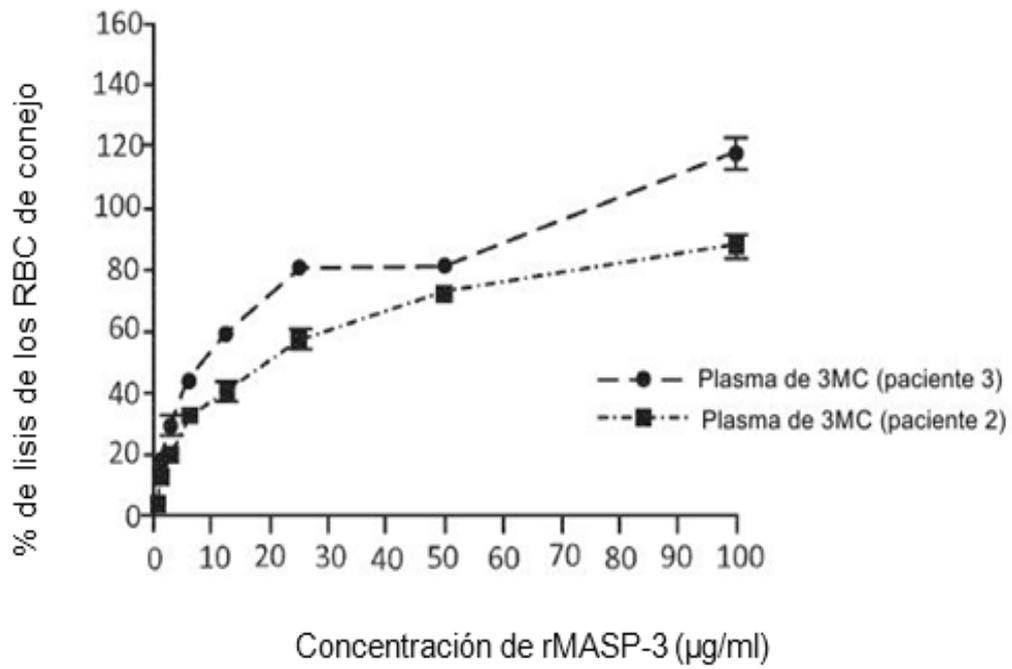


FIGURA 45



**FIGURA 46**

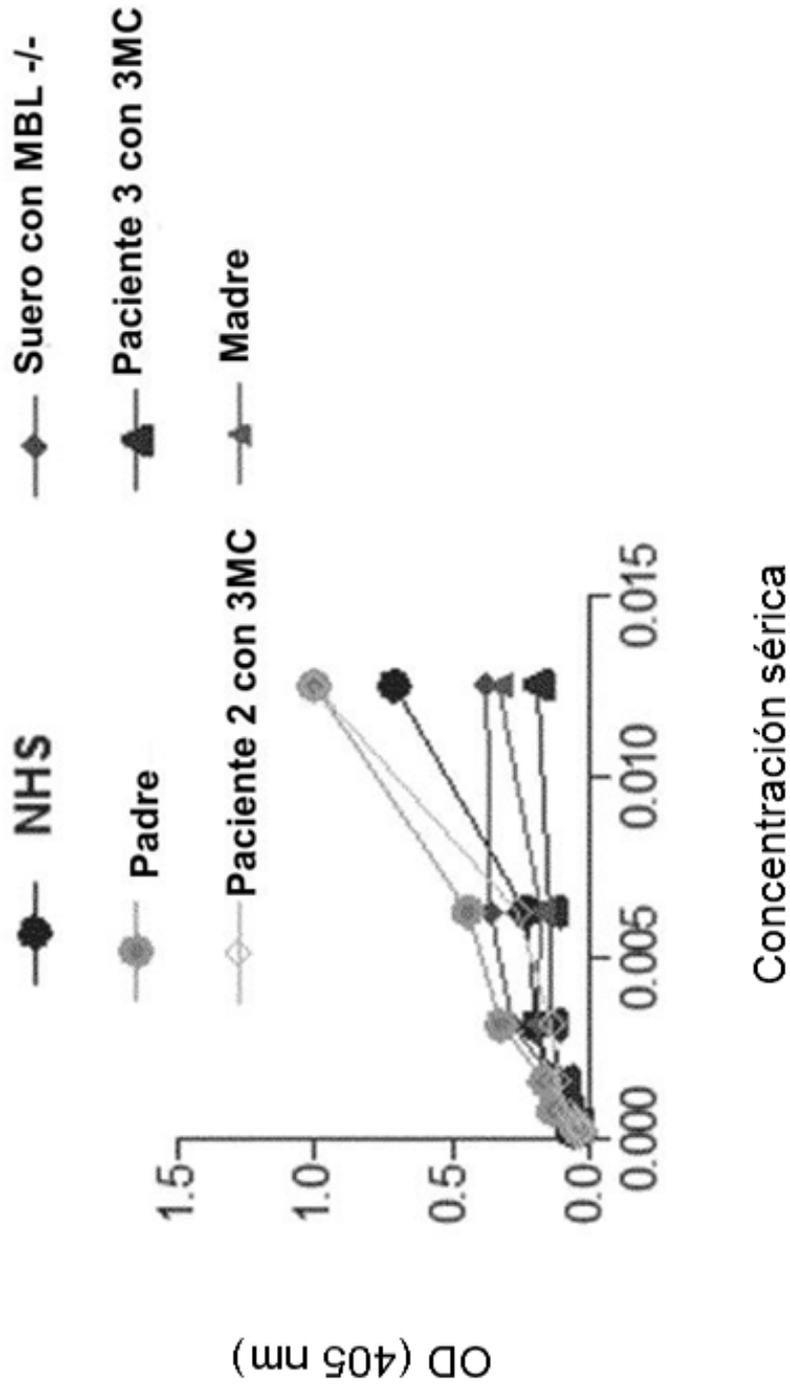


FIGURA 47