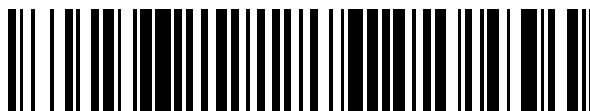


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 075**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012** **PCT/US2012/044974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013** **WO13006449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 12806897 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018** **EP 2726103**

54 Título: **Anticuerpos antiproperdina y usos de estos**

30 Prioridad:

01.07.2011 US 201161503900 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut
Street, Suite 200
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

SONG, WENCHAO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 701 075 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antiproperdina y usos de estos

Antecedentes de la invención

El sistema de complemento proporciona una primera línea de defensa del hospedante contra los patógenos invasores. El complemento también tiene una función patógena en las enfermedades inflamatorias humanas. La activación del sistema de complemento se produce a través de tres vías diferentes, la vía clásica (CP, por sus siglas en inglés), la vía de lectina (LP, por sus siglas en inglés) y la vía alternativa (AP, por sus siglas en inglés). La CP se inicia mediante la unión antígeno-anticuerpo. La LP se activa cuando lectinas de unión a manosa (MBL, por sus siglas en inglés) interactúan con moléculas de azúcar superficiales en microorganismos. La activación de ambas vías conduce al ensamblaje de la CP C3 convertasa C4b2a, aunque también se puede producir la escisión directa de C3 mediante serina proteasas asociadas a MBL. La AP es un bucle de autoamplificación impulsado por la AP C3 convertasa, C3bBb. La activación de la AP se puede producir de manera secundaria con respecto a la activación de CP o LP, o se inicia independientemente. En el último caso, un «tick-over» de C3 espontáneo de nivel bajo genera la C3bBb inicial, que propaga rápidamente la AP en ausencia de una regulación adecuada. Por lo tanto, generalmente se asume que la activación de AP en superficies no propias con regulación negativa nula o insuficiente se considera un proceso por defecto, mientras que las células autólogas típicamente evitan este resultado con la ayuda de múltiples proteínas inhibitoras del complemento unidas a membrana y en fase fluida. En ciertas condiciones, las células y tejidos autólogos alterados, dañados o estresados también pueden activar la AP y provocar una lesión inflamatoria.

A diferencia de la existencia de numerosas proteínas inhibitoras, la proteína plasmática properdina es el único regulador positivo conocido de la cascada de activación del complemento. La properdina es una glicoproteína plasmática de aproximadamente 53 kDa con una concentración en sangre estimada de 5-10 µg/ml. Existe en su mayoría como dímeros, trímeros y tetrámeros en una relación fija, en una conformación cabeza a cola. La opinión actual sobre la función de la properdina es que facilita la activación de la AP al extender la semivida de la convertasa C3bBb emergente. Según esta opción, la properdina tiene una función facilitadora, pero no esencial, en la activación de la AP. Dado que la activación de la CP y la LP invariablemente accionarán el bucle de amplificación de la AP, se espera que la properdina también promueva indirectamente la activación del complemento mediada por CP y LP. Por lo tanto, en virtud del conocimiento predominante previo a la presente invención, puede que no se considere a la properdina como una diana terapéutica anticomplemento atractiva ya que carece de la especificidad y no es indispensable para la activación del complemento.

Aunque las tres vías de activación del complemento ayudan al hospedante a combatir la infección microbiana, estudios recientes han demostrado que la patología mediada por el complemento en humanos, tal como la degeneración macular relacionada con la edad, el síndrome urémico hemolítico atípico, la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH, por sus siglas en inglés), la artritis reumatoide, el asma alérgica y la lesión por isquemia-reperfusión, es principalmente mediada por la AP. Por lo tanto, todavía permanece la necesidad en la técnica de composiciones anticomplemento y métodos para tratar enfermedades inflamatorias humanas al inhibir selectivamente la AP mientras se dejan intactas la CP y la LP para combatir los patógenos y proteger al hospedante contra la infección. La presente invención satisface esta necesidad.

Perdikoulis et al (Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, tomo 1548, n.º 2, páginas 265-277) describen anticuerpos policlonales capaces de unirse a TSR5 de properdina humana.

Sumario

La presente invención se refiere a un anticuerpo antiproperdina y métodos para inhibir la vía alternativa (AP) del complemento usando un anticuerpo antiproperdina.

La presente invención proporciona una composición como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y una composición para el uso según se establece en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8. En la presente memoria se describe una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a properdina. En composiciones preferidas, la properdina es properdina humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas composiciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas composiciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico.

En una composición, el anticuerpo comprende las CDR VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; y VL-CDR3: SEQ ID NO:10. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID

NO: 7. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que comprende al menos un aminoácido de la SEQ ID NO:52.

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42. En otra realización, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44. En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:47. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:47.

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:63. En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:64. En otra realización, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:63 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:64.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo que se une a properdina y compite con la unión del anticuerpo designado mAb 19.1 a properdina.

En la presente memoria se describe un método para tratar una patología mediada por la vía alternativa (AP) en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo al menos uno de los anticuerpos antiproperdina descritos en la presente memoria.

La patología mediada por la vía alternativa (AP) se selecciona del grupo que consiste en: degeneración macular, lesión por isquemia-reperfusión, artritis, artritis reumatoide, síndrome de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS, por sus siglas en inglés), asma, sepsis en trasplante de órgano, inflamación, glomerulonefritis, lupus y combinaciones de estas. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina inhibe selectivamente la vía alternativa, pero no inhibe la vía clásica ni la vía de lectina. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina no afecta el bucle de amplificación de AP de la vía clásica y la vía de lectina. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina inhibe la generación de una proteína de C3bBb.

En la presente memoria se describe un ratón transgénico que expresa properdina humana (p. ej., SEQ ID NO:67; SEQ ID NO:54), pero no expresa properdina murina.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

La Figura 1 es un esquema de las vías del complemento. El complemento se puede activar a través de tres vías: la clásica, la de lectina y la alternativa. La vía clásica se activa cuando C1q se une al anticuerpo acoplado al antígeno y activa a C1r y C1s que escinden a C4 y C2. La vía de la lectina se activa cuando la lectina de unión a manosa (MBL) encuentra motivos de carbohidrato patógeno conservados y activa las serina proteasas asociadas a MBL (MASP) y nuevamente se escinden C4 y C2. Los productos de la escisión de C4 y C2 forma la C3 convertasa de las vías clásica y de la lectina, C4bC2a que escinde a C3 en C3b y C3a. Una segunda molécula de C3b se puede asociar con C4bC2a para formar la C5 convertasa de las vías clásica y de la lectina, C4bC2aC3b. La vía alternativa (AP) se activa cuando C3 experimenta hidrólisis espontánea y forma la AP C3 convertasa inicial, C3(H₂O)Bb, en presencia de los Factores B y D, que conduce a la escisión de C3 adicional y la eventual formación de AP C3 convertasa (C3bBb) y AP C5 convertasa (C3bBbC3b). La properdina facilita la activación de AP al estabilizar las AP convertasas. Las tres vías culminan en la formación de las convertasas, que a su vez generan los principales efectores del sistema de complemento: las anafilatoxinas (C4a/C3a/C5a), el complejo de ataque a membrana (MAC) y las opsoninas (p. ej., C3b). Las anafilatoxinas son moléculas proinflamatorias potentes derivadas de la escisión de C4, C3 y C5. El MAC es un ensamblaje terminal de componentes del complemento C5b a C9 que puede causar directamente la lisis de las superficies diana. C3b induce la fagocitosis de dianas opsonizadas y también sirve para amplificar la activación del complemento a través de la AP.

La Figura 2 representa los resultados de experimentos que demuestran la inhibición dependiente de la dosis de la activación del complemento por AP inducida por LPS mediante el mAb 19.1, 22.1, 25 y 30. Los 4 clones de mAb inhibieron eficazmente la activación del complemento por AP cuando se agregaron a suero humano normal (NHS, por sus siglas en inglés) al 50 % en una concentración final de 5 µg/ml. Una muestra con EDTA agregado (NHSEDTA) sirvió como testigo negativo (EDTA bloquea la activación del complemento). Una muestra sin mAb agregado (0 Ab) sirvió como la activación de complemento por AP inicial. El experimento se llevó a cabo en tampón GVB-EGTA-Mg⁺⁺. Las placas de ELISA se recubrieron con LPS durante toda la noche. El NHS se preincubó con

mAb antes de la adición a la placa. La activación del complemento por AP se detectó al medir la cantidad de depósito de C3 sobre la placa (OD450).

La Figura 3 representa los resultados de experimentos que demuestran que los mAb antiproperdina humana inhiben la lisis de eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés) humanos causada por la disfunción de fH y DAF. Los RBC humanos no se lisan en ausencia de suero humano (solo Eh). También son resistentes a la lisis por suero humano (al 50 %) en ausencia de fH 19-20, un fragmento de fH recombinante que evita la interacción de fH con células autólogas (0fh1920). Sin embargo, cuando los RBC humanos se incuban con suero humano al 50 % en presencia de 30 μ M de fH 19-20 y 7,5 μ g/ml de un mAb anti-factor acelerador de declive (DAF, un regulador de complemento membranario) bloqueante de función (fh1920+AntiCD55), aproximadamente 70 % de los RBC se lisan. Esta lisis se inhibió completamente mediante cada uno de los 4 mAb antiproperdina (19.1, 22.1, 25, 30) a 5 μ g/ml. Una muestra de RBC tratadas con agua destilada (Eh + DDW) causó la lisis completa y sirvió como testigo positivo. Una muestra de RBC en suero humano normal tratado con EDTA (NHSEDTA) sirvió como testigo negativo (sin lisis, porque la EDTA bloquea la activación del complemento). Los ensayos de lisis se llevaron a cabo en tampón Mg++-EGTA GVB++ para permitir solo la activación del complemento por AP.

La Figura 4 representa los resultados de experimentos que evalúan RBC de oveja sensibilizados a anticuerpo incubados con suero humano normal al 50 % (NHS) en ausencia o presencia de 5 μ g/ml de mAb antiproperdina. Una muestra de RBC sin suero humano agregado (solo ShEs) no exhibió lisis; los RBC incubados con NHS al 50 % sin mAb antiproperdina agregados exhibieron lisis completa (NHS al 50 %); los RBC incubados con NHS al 50 % y 5 μ g/ml de mAbs 19.1, 22.1, 25 o 30 también se lisaron completamente, lo que demuestra que los mAbs no tenían efecto inhibitor sobre la lisis por complemento mediada por la vía clásica de RBC de oveja sensibilizados. Los RBC incubados con NHS al 50 % en presencia de EDTA (NHSEDTA) no sufrieron lisis, lo que demuestra que la lisis estaba mediada por el complemento; los RBC de oveja tratados con agua destilada (Es+ DDW) sirvieron como testigo de 100 % de lisis.

La Figura 5, que comprende las Figuras 5A-5C, representa los resultados del mapeo de epítomos para el mAb 19.1 y 25 y la generación de mutantes de eliminación de properdina humana (fP). La Figura 5a representa la secuencia de aminoácidos deducida de la properdina humana (SEQ ID NO:54). El péptido señal está subrayado. La proteína madura comienza en el residuo 28. La Figura 5b representa las secuencias de aminoácidos de los 7 dominios de repetición de tromboespondina (TSR, por sus siglas en inglés) de la properdina humana. Son los siguientes: TSR0 (SEQ ID NO:55), TSR1 (SEQ ID NO:56), TSR2 (SEQ ID NO:57), TSR3 (SEQ ID NO:58), TSR4 (SEQ ID NO:59), TSR5 (SEQ ID NO:60), TSR6 (SEQ ID NO:61). La Figura 5c representa los resultados del mapeo de epítomos para el mAb 19.1 y 25 y la generación de mutantes de eliminación de properdina humana (fP). La properdina humana (fP) está compuesta por 7 dominios de repetición de tromboespondina (TSR) que se enumeran de 0 a 6. Los dominios de TSR individuales (y en algunos casos dos dominios de TSR) se han suprimido y las proteínas mutantes se expresaron en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés). Todos los mutantes de eliminación de TSR se expresan en los tamaños esperados, excepto el mutante de eliminación TSR5 que es sustancialmente más pequeño que el tamaño esperado. Es probable que el mutante de eliminación TSR5 se haya sometido a proteólisis. El tamaño de la eliminación TSR5 es similar a la del mutante de eliminación TSR5+6, lo que sugiere que TSR6 puede haber sido retirado proteolíticamente en el mutante de eliminación TSR5. Los lisados de células CHO se analizaron mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-fP humana de cabra policlonal. M: marcador de peso molecular (MW, por sus siglas en inglés).

La Figura 6 representa los resultados del mapeo de epítomos para el mAb 19.1 y 25 y los ensayos ELISA del mAb 19.1 y 25 que se unen a los mutantes de eliminación de la properdina humana. Los lisados de células CHO se recubrieron sobre placas de ELISA y se detectaron con el mAb 19.1 o 25. Un tercer mAb 29.3 que se une a un epítipo diferente de 19.1 y 25 se usó como testigo para confirmar la expresión proteica. Los resultados muestran que ambos mAb 19.1 y 25 hicieron reacción con los siguientes mutantes de eliminación: dTSR0, dTSR1, dTSR2, dTSR3, dTSR4. Por lo tanto, se puede concluir que los epítomos para el mAb 19.1 y 25 no están ubicados en TSR 0-4. Además, el mAb 19.1 perdió la capacidad de unión a dTSR5 y dTSR 5+6, pero conservó la capacidad de unión a dTSR6, lo que sugiere que este epítipo está ubicado en TSR5. El mAb 25 perdió la capacidad de unión a dTSR5, dTSR5+6 y dTSR6, lo que sugiere que su epítipo está ubicado en TSR 5-6. Sin embargo, debido a que dTSR5 experimentó degradación proteolítica que conduce a la posible retirada de TSR6 (Figura 5), es probable que el epítipo para el mAb 25 esté ubicado en TSR6. HuP se refiere a la transfección de la properdina humana de longitud completa que se usa como testigo positivo. Con se refiere al lisado de células CHO no transfectadas que se usó como testigo negativo para la ausencia de unión. Todas las proteínas mutantes contenían una etiqueta 6X His en el extremo C.

La Figura 7 representa los resultados del mapeo de epítomos que muestra el epítipo de mAb 19.1 mapeado en la mitad del extremo C de TSR5 con la secuencia de aminoácidos: RGRTCRGRKFDGHRGAGQQQDIRHCYSIQHCP (SEQ ID NO:52). Debido a que TSR0-4 (es decir, dTSR5+6) no hizo reacción con el mAb 19.1, mientras que TSR0-5 (es decir, dTSR6) hizo reacción 19.1 (Figura 6), se generaron mutantes de eliminación adicionales: TSR0-4 + 1/4 TSR5, TSR0-4 + 1/2 TSR5 y TSR0-4 + 3/4 TSR5. Las proteínas de properdina mutantes, pero no intactas contenían una etiqueta 6X His en su extremo C. El análisis de transferencia Western usando anticuerpos anti-fP humana y anti-

etiqueta His mostró TSR0-4 + $\frac{3}{4}$ TSR5 no se expresaba bien. Se confirmó que los otros dos mutantes, TSR0-4 + $\frac{1}{4}$ TSR5 y TSR0-4 + $\frac{1}{2}$ TSR5, se expresaban, pero ninguno fue reconocido por el mAb 19.1, lo que sugiere que han perdido el epítipo para el mAb 19.1. Por lo tanto, se puede concluir que los residuos de epítipo clave para el mAb 19.1 están ubicados dentro de la mitad del extremo C de TSR5 (SEQ ID NO:52).

5 La Figura 8, que comprende las Figuras 8A y 8B, representa los resultados del mapeo de epítipos que muestra el epítipo del mAb 25. En la Figura 8A, los datos indican el epítipo mapeado en el segmento del cuarto del extremo C de TSR6 con la secuencia de aminoácidos: LVVEEKRPCLHVPACKDPEEEEL (SEQ ID NO:53). Debido a que TSR0-5 (es decir, dTSR6) perdió la capacidad de unión al mAb 25, se concluyó que TSR6 constituye al menos parte del epítipo del mAb 25. Se generaron mutantes adicionales de TSR6 de la siguiente manera: TSR0-5+ $\frac{1}{4}$ TSR6, 10 TSR0-5+ $\frac{1}{2}$ TSR6 y TSR0-5+ $\frac{3}{4}$ TSR6. Las proteínas de proteridina mutantes, pero no intactas, contenían una etiqueta 6X His en su extremo C. Como se muestra mediante la transferencia Western con los anticuerpos anti-fP humana y anti-etiqueta His, los tres mutantes se expresaron satisfactoriamente. Los experimentos de unión por ELISA mostraron que los tres mutantes perdieron la capacidad de unión al mAb 25. Como testigo positivo, todas las proteínas mutantes hicieron reacción con el mAb 19.1. Este resultado sugiere que el segmento del último cuarto de 15 TSR6 (con la secuencia designada por SEQ ID NO:53) constituye una parte clave del epítipo del mAb 25. HuP se refiere a células CHO transfectadas con fP humana de longitud completa (intacta) como testigo positivo; ConLysate se refiere a células CHO no transfectadas como testigos negativos para la unión. En la Figura 8B, los datos indican que el epítipo del mAb 25 depende de dos residuos de cisteína en TSR6 (SEQ ID NO: 61, que se muestran en la Figura 5B). Estos son cisteína 62 (C62) y cisteína 78 (C78) de TSR6. La mutación simple a Alanina (A) de C62 o 20 C78 en la proteridina humana de longitud completa no suprimió la capacidad de unión al mAb 25, pero mutaciones dobles de C62A y C78A suprimieron la unión a mAb 25. Como testigo positivo de la expresión proteica mutante, el mAb 19.1 exhibió reactividad para todas las muestras. Este resultado sugiere que C78 dentro del segmento del último cuarto de TSR6 (con la secuencia designada por SEQ ID NO:53), así como C62 que se ubica fuera de la SEQ ID NO:53, pero dentro de TSR6 (SEQ ID NO: 61), constituyen dos residuos esenciales del epítipo del mAb 25. Los 25 ensayos de unión de los mAb 19.1 y 25 se llevaron a cabo en placas ELISA usando homogenizados de células CHO transfectadas. HuP se refiere a células CHO transfectadas con fP humana de longitud completa (intacta) como testigo positivo; Con se refiere a células CHO no transfectadas como testigos negativos para la unión. Las otras muestras de células CHO transfectadas con ADNc de fP humana mutante contenían mutaciones de C62A y C78A simples o dobles.

30 La Figura 9 representa las secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias de región variable de las cadenas pesadas (SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2) y ligeras (SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7) del mAb 19.1, incluidas las CDR (VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; VL-CDR3: SEQ ID NO:10).

35 La Figura 10 representa las secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias de región variable de las cadenas pesadas (SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12) y ligeras (SEQ ID NO:16; SEQ ID NO:17) del mAb 25, incluidas las CDR (VH-CDR1: SEQ ID NO:13; VH-CDR2: SEQ ID NO:14; VH-CDR3: SEQ ID NO:15; VL-CDR1: SEQ ID NO:18; VL-CDR2: SEQ ID NO:19; VL-CDR3: SEQ ID NO:20).

40 La Figura 11 representa las secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias de región variable de las cadenas pesadas (SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22) y ligeras (SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27) del mAb 22.1, incluidas las CDR (VH-CDR1: SEQ ID NO:23; VH-CDR2: SEQ ID NO:24; VH-CDR3: SEQ ID NO:25; VL-CDR1: SEQ ID NO:28; VL-CDR2: SEQ ID NO:29; VL-CDR3: SEQ ID NO:30).

45 La Figura 12 representa las secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias de región variable de las cadenas pesadas (SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32) y ligeras (SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:37) del mAb 30, incluidas las CDR (VH-CDR1: SEQ ID NO:33; VH-CDR2: SEQ ID NO:34; VH-CDR3: SEQ ID NO:35; VL-CDR1: SEQ ID NO:38; VL-CDR2: SEQ ID NO:39; VL-CDR3: SEQ ID NO:40).

La Figura 13 representa la secuencia de aminoácidos humanizada de la región variable de la cadena pesada del mAb 19.1 (VH-4-59-01 de 19.1 humanizada (SEQ ID NO:42); VH-3-66-04 de 19.1 humanizada (SEQ ID NO:44)) después del injerto de CDR usando dos secuencias de VH de línea germinales humanas (VH 4-59-01 humana (SEQ ID NO:41); VH 3-66-04 humana (SEQ ID NO:43)).

50 La Figura 14 representa la secuencia de aminoácidos humanizada de la región variable de la cadena ligera del mAb 19.1 (VL-4-1-01 de 19.1 humanizada (SEQ ID NO:47)) después del injerto de CDR usando una secuencia de VL de línea germinal humana (VL 4-1-01 humana (SEQ ID NO:45); JK2 humana (SEQ ID NO:46)).

55 La Figura 15 representa la secuencia de aminoácidos humanizada de la región variable de la cadena pesada del mAb 25 (25-VH-1-69-06 humanizada (SEQ ID NO:49)) después del injerto de CDR usando una secuencia de VH de línea germinal humana (VH 1-69-06 humana (SEQ ID NO:48)).

La Figura 16 representa la secuencia de aminoácidos humanizada de la región variable de la cadena ligera de mAb 25 (25-VL-1-69-06 humanizada (SEQ ID NO:51)) después del injerto de CDR usando una secuencia de VL de línea germinal humana (VL 1-69-06 humana (SEQ ID NO:50)); Jk3 humana (SEQ ID NO:62).

La Figura 17, que comprende las Figuras 17A y 17B, representa los resultados de experimentos que evalúan los mAb 19.1 recombinantes quiméricos y humanizados. La Figura 17A representa la secuencia de aminoácidos de la región pesada constante de IgG4 humana, con la mutación Serina 229 a Prolina (SEQ ID NO:63), y la región ligera constante kappa humana (SEQ ID NO:64). Estas secuencias se usaron para construir anticuerpos antipropedina quiméricos (región variable de ratón + región constante humana) y humanizados (región variable de ratón humanizada + región constante humana). La Figura 17B representa los resultados de experimentos que evalúan la expresión de mAb 19.1 recombinantes quiméricos y humanizados. Análisis SDS PAGE del mAb 19.1 recombinante quimérico y dos mAb 19.1 humanizados. La construcción de la cadena pesada de 19.1 quimérica se logró al unir la región VH de 19.1 con la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana. La construcción de la cadena ligera de 19.1 quimérica se logró al unir la región VL de 19.1 con la región constante de la cadena kappa humana. Las cadenas pesada y ligera de 19.1 humanizadas se construyeron del mismo modo, es decir, la región VH humanizada se unió a la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana y la cadena ligera humanizada se unió a la región constante de la cadena kappa humana. Las células CHO se cotransfectaron con ADNc de cadena pesada y ligera y se establecieron líneas estables mediante selección de fármaco. Para los dos mAb humanizados, cada una de las cadenas pesadas humanizadas se apareó con la misma cadena ligera humanizada para la transfección. Los mAb expresados se purificaron del medio de cultivo de células CHO mediante una columna de afinidad por proteína G.

La Figura 18 representa los resultados de experimentos que miden las afinidades de unión por antígeno de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado usando Biacore. La fP humana purificada se acopló a un chip CM4 usando el método de acoplamiento por amina. El análisis Biacore se llevó a cabo en un instrumento Biacore-2000. El chip se regeneró entre cada unión usando 50 mM de NaOH.

La Figura 19 representa los resultados de experimentos que miden las afinidades de unión por antígeno de los mAb 25, 22.1 y 30 según se determinaron mediante análisis Biacore. La fP humana purificada se acopló a un chip CM4 usando el método de acoplamiento por amina. El análisis Biacore se llevó a cabo en un instrumento Biacore-2000. El chip se regeneró entre cada unión usando 50 mM de NaOH.

La Figura 20 representa los resultados de experimentos que evalúan las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado en el bloqueo de la activación del complemento por AP humana inducida por LPS. Las placas de ELISA se recubrieron con LPS durante toda la noche, y se agregó suero humano normal (NHS) al 50 % diluido en GVB-mg-EGTA y se incubaron a 37 °C durante 1 hora antes de la detección del depósito de C3 usando anticuerpos anti-C3. El NHS sin anticuerpo agregado sirvió como testigo positivo (NHS) y NHS con EDTA agregado sirvió como testigo negativo (NHSEDTA). Para el mAb 19.1, las concentraciones de 5 µg/ml y 10 µg/ml fueron suficientes para inhibir la activación del complemento. Para los mAb 19.1 quimérico y los dos humanizados, una concentración de 5 µg/ml no fue suficiente para inhibir la activación del complemento. Sin embargo, las concentraciones de 10 µg/ml y 20 µg/ml fueron eficaces para bloquear la activación del complemento por AP.

La Figura 21 representa los resultados de experimentos que evalúan las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado en el bloqueo de la lisis de RBC humanos mediante el complemento AP humano en el contexto de la disfunción de fH y DAF. Los RBC humanos se incubaron con suero humano normal al 50 % en presencia de fH19-20 (30 µM) y anticuerpo anti-DAF (7,5 µg/ml). El suero humano se diluyó en GVB-Mg++-EGTA y la incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hora. Antes de agregarlo a los RBC, el suero humano se preincubó con concentraciones crecientes de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado (1-15 µg/ml) a 4 °C durante 1 hora. Hubo una inhibición dependiente de la dosis de la lisis de RBC mediante los 4 mAb. Sin embargo, la CE50 para los mAb 19.1 quimérico y humanizado fue más alta que para el mAb 19.1. Este resultado fue compatible con los datos que se muestra en la Figura 20.

La Figura 22 representa los resultados de experimentos que evalúan las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado en el bloqueo de la activación del complemento por AP de mono Resus inducida por LPS. Las placas de ELISA se recubrieron con LPS durante toda la noche, y se agregó suero de mono Resus normal (NRS) al 50 % diluido en GVB-Mg++-EGTA y se incubaron a 37 °C durante 1 hora antes de la detección del depósito de C3 usando anticuerpos anti-C3 humano. El NRS sin anticuerpo agregado sirvió como testigo positivo (NRS) y NRS con EDTA agregado sirvió como testigo negativo (NRSEDTA). Para los mAb 19.1 y 19.1 quimérico, las concentraciones de 10-40 µg/ml fueron suficientes para inhibir la activación del complemento de mono Resus. Para los dos mAb 19.1 humanizados, las concentraciones de 30 o 40 µg/ml fueron eficaces para inhibir la activación del complemento. Las concentraciones de 10 o 20 µg/ml también inhibieron sustancialmente la activación del complemento por AP en mono Resus.

La Figura 23 representa los resultados de experimentos que evalúan las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y 19.1 humanizado en el bloqueo de la activación del complemento por AP en mono cangrejo inducida

por LPS. Las placas de ELISA se recubrieron con LPS durante toda la noche, y se agregó suero de mono cangrejero normal (NCS) al 50 % diluido en GVB-Mg++-EGTA y se incubaron a 37 °C durante 1 hora antes de la detección del depósito de C3 usando anticuerpos anti-C3 humano. El NCS sin anticuerpo agregado sirvió como testigo positivo (NCS) y el NCS con EDTA agregado sirvió como testigo negativo (NCSEDTA). Para el mAb 19.1, las concentraciones de 10-40 µg/ml fueron suficientes para inhibir la activación del complemento por AP en el mono cangrejero. Para el mAb 19.1 quimérico, las concentraciones de 20-40 µg/ml fueron suficientes para inhibir la activación del complemento por AP en el mono cangrejero, pero una concentración de 10 µg/ml también inhibió significativamente la activación del complemento. Para los dos mAb 19.1 humanizados, las concentraciones de 30 o 40 µg/ml fueron eficaces para inhibir la activación del complemento en el cangrejero. Sin embargo, una concentración de 20 µg/ml también inhibió sustancialmente la activación del complemento por AP en el mono cangrejero. Una concentración de 10 µg/ml también inhibió parcialmente la actividad del complemento por AP en el cangrejero.

La Figura 24 representa los resultados de experimentos que evalúan la inhibición de la lisis en suero acidificado de eritrocitos de paciente con PNH (prueba de Ham) mediante el mAb 19.1, 25 y 19.1 humanizado. Los RBC de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) se sometieron a la prueba de suero acidificado de Ham en presencia o ausencia de mAb. Los RBC se incubaron con suero autólogo (concentración final de 83 %) a 37°C durante 2 horas y se calculó el porcentaje de lisis al medir la OD405 del sobrenadante, normalizada con respecto a una muestra de RBC completamente lisada mediante agua destilada (Eh DDW). La mezcla de incubación estaba compuesta por lo siguiente: 240 µl de suero, 25 µl de HCL 1/6 (o 25 µl de disolución salina para los testigos negativos), 12,5 µl de suspensión de RBC al 50 % (v/v), 10 µl de mAb en disolución salina. Se usó una muestra de RBC incubados con suero autólogo no acidificado (NHS) como testigo negativo (lisis de fondo). En la ausencia de mAb, aproximadamente el 50 % de los RBC se lisaron mediante el suero acidificado. Esta lisis se inhibió completamente mediante el mAb 19.1 a 8 µg/ml y concentración mayor, mediante un mAb 19.1 humanizado (n.º 459) a la concentración de 20 µg/ml y mediante el mAb 25 a la concentración de 8 µg/ml y mayor.

La Figura 25, que comprende las Figuras 25A-25E, representa la generación de un ratón humanizado con properdina. Se construyó un vector de expresión de fP humana según se ilustra en el esquema de la Figura 25A, usando el promotor β-actina de pollo con potenciador CVM-IE y la cola poli A de β-globina de conejo para la expresión estable del ADNc en células eucariotas. Este plásmido se linealizó y microinyectó en los cigotos de ratones C57BL/6 para producir los ratones fundadores transgénicos con fP humana. Mediante barrido por PCR (usando cebadores específicos para fP humana 5'-ATCAGAGGCCTGTGACACC-3' (SEQ ID NO:65) y 5'-CTG CCCTTGTAGCTCCTCA-3' (SEQ ID NO:66)), se identificaron ratones fundadores positivos (que exhiben un fragmento de ADNc de fP humana de aproximadamente 800 bp). De 40 ratones analizados, cinco (núms. 15, 20, 24, 27 y 32) eran positivos (Figura 25B, flechas rojas). Se llevaron a cabo ensayos ELISA para detectar la fP humana en los ratones positivos transgénicos (Figura 25C). Se recubrió una placa con mAb no bloqueante contra fP humana (clon 8.1). Después de la incubación con suero diluido (10 %), la fP humana se detectó mediante ELISA usando un anticuerpo anti-fP humana de cabra conjugado con HRP. El suero humano normal (NHS) se usó como testigo positivo. Como puede observarse, la fP humana se detectó en NHS y en los sueros de los 5 ratones transgénicos, pero no en el suero de ratón normal (NMS) (es decir, no transgénico), transgénico negativo (n.º 29) o en el suero de ratón fP^{-/-}. El ratón fundador n.º 32 se reprodujo con ratones naturales y las crías se sometieron a barrido por PCR, según se describió anteriormente. Tres ratones F1 representativos, uno negativo en PCR (F1-429) y dos positivos en PCR (F1-430 y F1-431), se sometieron a prueba mediante ELISA para determinar la presencia de fP humana en su suero (Figura 25D). Como se muestra, la fP humana se detectó en los dos ratones positivos en la PCR, pero no en el ratón negativo en la PCR. Los sueros de NHS y el genitor fundador (n.º 32) se usaron como testigos positivos. Este resultado sugirió que el transgén es estable y puede transmitirse a través de la línea germinal. El ratón fundador n.º 32 a continuación se reprodujo con ratones fP^{-/-} para generar ratones fP^{-/-}-transgén de fP humana +. El ensayo de activación del complemento por AP inducida por LPS mostró que los ratones fP^{-/-}-transgén de fP humana +, pero no los ratones fP^{-/-}, tenían actividad de complemento por AP en suero indistinguible de la de ratones naturales (Figura 25E), lo que sugiere que la fP humana expresada transgénicamente fue capaz de rescatar el fenotipo de los ratones fP^{-/-}. El suero natural tratado con EDTA se usó como testigo negativo. Este resultado confirmó que se generó una línea de ratón humanizado con properdina.

La Figura 26 representa experimentos que examinan la actividad in vivo y la cinética del mAb 25 en ratones «humanizados con properdina». Se inyectó a un ratón humanizado con properdina (fP^{-/-}-transgén de fP humana +) 0,5 mg (i.p.) de mAb 25. Se recogieron muestras de suero antes de la inyección (0 hr) y después en diversos puntos de tiempo después de la inyección y se sometieron a prueba para determinar la activación del complemento por AP inducida por LPS. Como se muestra, no había presencia de actividad de complemento por AP en el suero del ratón fP^{-/-} o en el suero natural tratado con EDTA. En cambio, se detectó actividad de complemento por AP en el suero natural y en el suero del ratón humanizado con fP en el tiempo 0 hr (antes del tratamiento con mAb). La actividad por complemento de AP en el ratón humanizado permaneció indetectable a las 8, 24 y 48 horas después del tratamiento con el mAb, pero se volvió detectable a las 72, 96 y 120 horas. Estos resultados sugieren que a una dosificación de 0,5 mg/ratón, el mAb 25 fue capaz de inhibir la actividad de complemento por AP in vivo durante 48 horas.

La Figura 27 representa los resultados de un experimento que demuestra que el mAb 19.1 antiproperdina humana previene la hemólisis extravascular (EVH, por sus siglas en inglés). En este modelo de EVH, los ratones humanizados con properdina (n=4 por grupo experimental) recibieron transfusión de eritrocitos (RBC) de ratones con triple inactivación Crry/DAF/C3 (TKO, por sus siglas en inglés). Los ratones receptores (ratones humanizados con properdina) se trataron 6 horas antes de la transferencia de los RBC con el mAb 19.1 (2 mg/ratón, i.p.) o un mAb de IgG1 de ratón testigo (MOPC, purificado a partir del hibridoma MoPC 31C, de ACTT). Los RBC se cosecharon de los ratones TKO donantes, se lavaron en PBS y se etiquetaron con CFSE antes de la inyección (a través de la vena de la cola) en los ratones receptores, según el procedimiento publicado anteriormente (Miwa et al., 2002, Blood 99: 3707-3716). Cada ratón receptor recibió RBC equivalentes a 100 µl de sangre. A los 5 minutos y 6, 24, 48, 72, 96, 120 horas después de la transfusión de RBC, se extrajo sangre de los ratones receptores y los RBC se analizaron para determinar la cantidad de RBC etiquetados con CFSE (es decir, transfundidos) restantes en la circulación. La cantidad de RBC etiquetados con CFSE en cada receptor se normalizó (como %) con respecto a la detectada en el punto de tiempo de 5 min. En los ratones receptores tratados con la IgG testigo (MOPC), los RBC de TKO se eliminaron rápidamente a través de EVH, congruente con los hallazgos previos (Miwa et al., 2002, Blood 99: 3707-3716). Sin embargo, en ratones receptores tratados con el mAb 19.1 antiproperdina humana, no se produjo EVH y los RBC transfundidos persistieron, lo que demuestra que el mAb antiproperdina fue eficaz en la prevención de la EVH.

La Figura 28 representa la secuencia de ácido nucleico del ADNc de properdina humana (SEQ ID NO:67) usado para generar los ratones transgénicos con properdina humana.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la inhibición de la vía alternativa (AP) del complemento usando un anticuerpo antiproperdina. La invención se refiere a composiciones y métodos para tratar una patología mediada por AP o afección mediada por AP en un individuo al poner en contacto al individuo con un anticuerpo antiproperdina. Las patologías y afecciones mediadas por AP que se pueden tratar con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular, lesión por isquemia-reperfusión, artritis, artritis reumatoide, asma, síndrome de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome urémico hemolítico atípico, (aHUS), sepsis, trasplante de órgano, inflamación (incluida, pero sin limitarse a, inflamación asociada a cirugía de derivación cardiopulmonar y diálisis renal), glomerulonefritis (incluida, pero sin limitarse a, glomerulonefritis mediada por anticuerpo antineutrófilo citoplasmático (ANCA, por sus siglas en inglés), lupus y combinaciones de estos.

Definiciones

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica al cual corresponde esta invención. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para poner en práctica o evaluar la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Según se usa en la presente memoria, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

Los artículos «un» y «uno» se usan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

Los términos «inhibir» e «inhibición», según se usan en la presente memoria, significan reducir, suprimir, disminuir o bloquear una actividad o función al menos aproximadamente un 10 % con respecto a un valor testigo. Preferiblemente, la actividad se suprime o bloquea un 50 % en comparación con un valor testigo, más preferiblemente un 75 %, e incluso más preferiblemente, un 95 %.

Los términos «cantidad eficaz» y «cantidad farmacéuticamente eficaz» se refieren a una cantidad suficiente de un agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Dicho resultado puede ser la reducción y/o alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o trastorno, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Un experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz adecuada en cualquier caso individual mediante el uso de experimentos de rutina.

Los términos «paciente», «sujeto», «individuo» y similares se usan de manera intercambiable en la presente memoria, y hacen referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente, un humano, que tiene un sistema de complemento, incluido un humano que necesita tratamiento para, o es susceptible a, una afección o sus secuelas. El individuo puede incluir, por ejemplo, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, ratas, monos y ratones y humanos.

El término «anormal» cuando se usa en el contexto de organismos, tejidos, células o componentes de estos, se refiere a aquellos organismos, tejidos, células o componentes de estos que difieren en al menos una característica observable o detectable (p. ej., edad, tratamiento, momento del día, etc.) de aquellos organismos, tejidos, células o componentes de estos que exhiben la característica respectiva «normal» (esperada/homeostática). Las características que son normales o esperadas en un tipo de célula, tejido o sujeto podrían ser anormales para un tipo de célula o tejido diferente.

Una «enfermedad» es un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis, y en donde si la enfermedad no se mejora la salud del animal continúa deteriorándose.

En cambio, un «trastorno», en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable que como sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no causa necesariamente una disminución adicional del estado de salud del animal.

Una enfermedad o trastorno se «alivia» si la gravedad de un signo o síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que un paciente experimenta dicho signo o síntoma, o ambos, se reduce.

Una «cantidad eficaz» o «cantidad terapéuticamente eficaz» de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al cual se administra el compuesto.

Según se usa en la presente memoria, un «material instructivo» incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que puede usarse para comunicar la utilidad de un compuesto, composición, vector o sistema de suministro de la invención en el kit para producir el alivio de diversas enfermedades o trastornos mencionados en la presente memoria. Opcionalmente, o alternativamente, el material instructivo puede describir uno o más métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material instructivo del kit de la invención, por ejemplo, se puede fijar en un contenedor que contiene el compuesto, composición, vector, o sistema de suministro identificado de la invención o se puede enviar junto con un recipiente que contiene el compuesto, composición, vector o sistema de suministro identificado. Alternativamente, el material instructivo se puede enviar separado del contenedor con la intención del que el receptor use el material instructivo y el compuesto cooperativamente.

Un tratamiento «terapéutico» es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos de una patología, a los efectos de disminuir o eliminar dichos signos.

Según se usa en la presente memoria, «tratar una enfermedad o trastorno» significa reducir la frecuencia y/o gravedad de un signo y/o síntoma de la enfermedad, trastorno o patología que experimenta un paciente. Enfermedad, trastorno y patología se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

La frase «muestra biológica», según se usa en la presente memoria, pretende incluir cualquier muestra que comprende una célula, un tejido o un fluido corporal en la que se puede detectar la expresión de un ácido nucleico o polipéptido. Los ejemplos de dichas muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, linfa, médula ósea, biopsias y frotis. Las muestras que son de naturaleza líquida se denominan en la presente memoria «fluidos corporales». Las muestras biológicas se pueden obtener de un paciente mediante una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, raspar o hisopar un área o mediante el uso de una aguja para obtener fluidos corporales. Los métodos para recoger diversas muestras corporales se conocen en la técnica.

El término «anticuerpo», según se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo específico de un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales, o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpo intracelulares («intracuerpos»), Fv, Fab, Fab', F(ab)2 y F(ab')2, así como anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Por el término «anticuerpo sintético», según se usa en la presente memoria, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago, según se describe en la presente memoria. También debe interpretarse que el término significa un anticuerpo que se ha generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde el ADN o secuencia de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN o secuencia de aminoácidos sintética que está disponible y se conoce en la técnica.

Según se usa en la presente memoria, el término «anticuerpo de cadena pesada» o «anticuerpos de cadena pesada» comprende moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos, ya sea por inmunización con un péptido y posterior aislamiento del suero, o por la clonación y expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican dichos anticuerpos. El término «anticuerpo de cadena pesada» o «anticuerpos de cadena pesada» abarcan, además, moléculas de inmunoglobulina aisladas de un animal con enfermedad de cadena pesada, o se preparan mediante la clonación y expresión de genes de VH (inmunoglobulina de cadena pesada variable) de un animal.

Un «anticuerpo quimérico» se refiere a un tipo de anticuerpo genomanipulado que contiene una región variable de origen natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un «anticuerpo humanizado» se refiere a un tipo de anticuerpo genomanipulado que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, cuyas partes restantes derivadas de la inmunoglobulina de la molécula derivan de una (o más) inmunoglobulina(s) humana. Además, los residuos de soporte de marco se pueden alterar para conservar la afinidad de unión (véase, p. ej., 1989, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032; 1991, Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, p. ej., la base de datos de KABAT, la base de datos Los Alamos y la base de datos Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con las regiones de marco del anticuerpo donante (o con base en los aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región de marco variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones de marco constantes o variable de cadena ligera se puede seleccionar de manera similar. Cabe señalar que no es necesario que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor provengan del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe diversos modos de producir dichos anticuerpos humanizados (véanse, por ejemplo, EP-A-0239400 y EP-A-054951).

El término «anticuerpo donante» se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que contribuye las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, CDR u otros fragmentos o análogos funcionales de estas a un primer compañero de inmunoglobulina, para proporcionar la región codificante de inmunoglobulina alterada y el anticuerpo alterado expresado resultante con las características de especificidad antigénica y actividad neutralizante del anticuerpo donante.

El término «anticuerpo aceptor» se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo con respecto al anticuerpo donante, que contribuye todas (o cualquier porción, pero en algunas realizaciones todas) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones de marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

Las «CDR» se definen como las secuencias de aminoácidos de región de determinación de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina. Véase, p. ej., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4a Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Existen tres CDR de cadena pesada y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, las «CDR», según se usa en la presente memoria, se refieren a las tres CDR de cadena pesada o a las tres CDR de cadena ligera (o a todas las CDR de pesada y todas las de cadena ligera, si corresponde). La estructura y plegado proteico del anticuerpo pueden significar que otros residuos se consideran parte de la región de unión a antígeno y así lo entendería un experto. Véase, por ejemplo, Chothia et al., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p 877-883.

Según se usa en la presente memoria, un «inmunoensayo» se refiere a cualquier ensayo de unión que usa un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula diana para detectar y cuantificar la molécula diana.

Por el término «se une específicamente», según se usa en la presente memoria, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a dicho antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad en especies cruzadas no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a formas alélicas diferentes del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad en especies cruzadas no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico.

En algunos casos, los términos «unión específica» o «que se une específicamente», se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción es dependiente de la presencia de una estructura particular (p. ej., un determinante o epítipo antigénico) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de

a proteínas generalmente. Si un anticuerpo es específico para el epítipo «A», la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no etiquetado), en una reacción que contiene «A» etiquetado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A etiquetado unido al anticuerpo.

Una «región codificante» de un gen consiste en los residuos nucleotídicos de la hebra codificante del gen y los nucleótidos de la hebra no codificante del gen que son homólogos con o complementarios a, respectivamente, la región codificante de una molécula de ARNm que se produce mediante la transcripción del gen.

Una «región codificante» de una molécula de ARNm también consiste en los residuos nucleotídicos de la molécula de mRNA que se aparean con una región anticodónica de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifican un codón de terminación. Por lo tanto, la región codificante puede incluir residuos nucleotídicos que comprenden codones para residuos aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (p. ej., residuos aminoácidos en una secuencia señal de exportación de proteína).

«Complementario», según se usa en la presente memoria para hacer referencia a un ácido nucleico, se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos hebras de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma hebra de ácido nucleico. Se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno específicos («apareamiento de bases») con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela con respecto a la primera región, si el residuo es timina o uracilo. De manera similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera hebra de ácido nucleico es capaz de aparear bases con un residuo de una segunda hebra de ácido nucleico que es antiparalela con respecto a la primera hebra, si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo ácido nucleico o uno diferente si, cuando las dos regiones se disponen de manera antiparalela, al menos un residuo nucleotídico de la primera región es capaz de aparear bases con un residuo de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo cual, cuando la primera y segunda porciones se disponen de modo antiparalelo, al menos aproximadamente 50 %, y preferiblemente al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % de los residuos nucleotídicos de la primera porción son capaces de aparear bases con los residuos nucleotídicos en la segunda porción. Más preferiblemente, todos los residuos nucleotídicos de la primera porción son capaces de aparear bases con residuos nucleotídicos en la segunda porción.

El término «ADN», según se usa en la presente memoria, se define como ácido desoxirribonucleico.

«Codificar» se refiere a la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de estas. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a dicho gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia nucleotídica es idéntica a la secuencia del ARNm y normalmente se proporciona en los listados de secuencias, como la hebra no codificante, usada como la plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden referirse como que codifican la proteína u otro producto de dicho gen o ADNc.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, una «secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias nucleotídicas que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia nucleotídica que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida que la secuencia nucleotídica que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón(es).

«Aislado» significa alterado o retirado de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en su contexto normal en un animal vivo no está «aislado», pero que el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su contexto natural está «aislado». Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula hospedante.

Un «ácido nucleico aislado» se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, es decir, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento, es decir, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se produce naturalmente. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, es decir, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan naturalmente en la célula. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de una procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (es decir, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzima de restricción) independiente de otras secuencias.

También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se producen comúnmente. «A» se refiere a adenosina, «C» se refiere a citosina, «G» se refiere a guanosina, «T» se refiere a timidina y «U» se refiere a uridina.

El término «polinucleótido», según se usa en la presente memoria, se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, según se usan en la presente memoria, son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos que se pueden hidrolizar en los «nucleótidos» monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Según se usa en la presente memoria, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluidos, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, usando tecnología de clonación común y PCR, y similares, y mediante medios sintéticos.

Según se usan en la presente memoria, los términos «péptido», «polipéptido» y «proteína» se usan de manera intercambiable y se refiere a un compuesto comprendido por residuos aminoácidos covalentemente enlazados mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se fija ninguna limitación en cuanto a la cantidad máxima de aminoácidos que puede comprender una secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Según se usa en la presente memoria, el término se refiere a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Los «polipéptidos» incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de estos.

El término «progenie», según se usa en la presente memoria, se refiere a un descendiente o cría e incluye la cría de un mamífero, y también incluyen la célula descendiente diferenciada o indiferenciada derivada de una célula genitora. En un uso, el término progenie se refiere a una célula descendiente que es genéticamente idéntica a la genitora. En otro uso, el término progenie se refiere a una célula descendiente que es genéticamente y fenotípicamente idéntica a la genitora. En otro uso adicional, el término progenie se refiere a una célula descendiente que se ha diferenciado de la célula genitora.

El término «ARN», según se usa en la presente memoria, se define como ácido ribonucleico.

El término «ADN recombinante», según se usa en la presente memoria, se define como ADN producido al unir porciones de ADN de diferentes fuentes.

El término «polipéptido recombinante», según se usa en la presente memoria, se define como un polipéptido producido usando métodos de ADN recombinante.

Según se usa en la presente memoria, «conjugado» se refiere al acoplamiento covalente de una molécula a una segunda molécula.

«Variante», según se usa el término en la presente memoria, es una secuencia de ácido nucleico o una secuencia peptídica que difiere en secuencia de una secuencia de ácido nucleico o secuencia peptídica de referencia, respectivamente, pero conserva propiedades biológicas esenciales de la molécula de referencia. Los cambios en la secuencia de una variante de ácido nucleico pueden no alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por el ácido nucleico de referencia, o pueden resultar en sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos. Los cambios en la secuencia de variantes peptídicas son típicamente limitados o conservadores, para que las secuencias del péptido de referencia y la variante sean estrechamente similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y el péptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones en cualquier combinación. Una variante de un ácido nucleico o péptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se conoce por producirse naturalmente. Las variantes de origen no natural de ácidos nucleicos y péptidos pueden producirse mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

El término «reproducción» se usa en la presente memoria para hacer referencia a la propagación de una especie con el resultado que es al menos una cría.

El término «reproducción natural» se usa en la presente memoria para hacer referencia a la propagación de una especie mediante unión sexual.

El término «animal endogámico» se usa en la presente memoria para referirse a un animal que se cruza con otros animales similares de la misma especie para conservar y fijar ciertas características, o para evitar que se introduzcan otras características en la población de reproducción.

- 5 El término «animal exogámico» se usa en la presente memoria para referirse a un animal que se reproduce con cualquier otro animal de la misma especie sin tener en cuenta la conservación de ciertas características.

Intervalos: a lo largo de la presente descripción, diversos aspectos de la invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo se hace meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que ha descrito específicamente los subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como los números individuales dentro de dicho intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

- 15 La presente invención se refiere a la inhibición de la vía alternativa (AP) del complemento usando un anticuerpo antipropertina. En la presente memoria se describen métodos para tratar una patología mediada por AP o afección mediada por AP en un individuo al poner en contacto al individuo con un anticuerpo antipropertina.

20 En la presente memoria se describe un método para tratar una patología mediada por AP en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo un anticuerpo antipropertina e inhibir, de esta manera, la generación de un complejo proteico C3bBb. Los ejemplos de patologías mediadas por complemento que se pueden tratar usando los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular, lesión por isquemia-reperfusión, artritis, artritis reumatoide, síndrome de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS, por sus siglas en inglés), asma, sepsis en trasplante de órgano, inflamación, glomerulonefritis, lupus o combinaciones de estas.

- 25 La capacidad del sistema inmunitario para discernir entre antígenos «propios» y «no propios» es vital para el funcionamiento del sistema inmunitario como defensa específica contra microorganismos invasores. Los antígenos «no propios» son aquellos antígenos en sustancias que ingresan o están presentes en el cuerpo que son diferentes o extraños de manera detectable con respecto a los constituyentes del propio animal, mientras que los antígenos «propios» son aquellos que, en el animal sano, no son diferentes ni extraños de manera detectable con respecto a sus propios constituyentes. En diversos métodos descritos en la presente memoria, la activación de AP que se inhibe es la que se desencadenó por al menos uno del grupo que consiste en un antígeno microbiano, una superficie extraña no biológica, un tejido propio alterado o combinaciones de estas. Un ejemplo de una superficie extraña no biológica es un tubo para sangre tal como el que se usa en la cirugía de derivación cardiopulmonar o diálisis renal. Los ejemplos de tejidos propios alterados incluyen tejidos y células apoptóticos, necróticos o estresados por isquemia o combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos antipropertina descritos en la presente memoria inhiben selectivamente la AP, pero no inhiben la vía clásica (CP) ni la vía de lectina (LP). Generalmente, la CP se inicia mediante complejos antígeno-anticuerpo, la LP se activa mediante la unión de lectinas a moléculas de azúcar en superficies microbianas, mientras que la AP está constitutivamente activa a un nivel bajo, pero puede amplificarse rápidamente en superficies bacterianas, víricas y parasitarias debido a la falta de proteínas reguladoras. Normalmente, las proteínas reguladoras protegen a las células hospedantes de la activación del complemento por AP, pero en algunas situaciones, tal como cuando las proteínas reguladoras tienen defectos o no están, la AP también se puede activar de manera incontrolable en las células hospedantes, lo que conduce a una patología mediada por el complemento. La CP consiste en los componentes C1, C2, C4 y converge con la AP en la etapa de activación de C3. La LP consiste en lectinas de unión a manosa (MBL) serina proteasas asociadas a MBL (Masps) y comparte con la CP los componentes C4 y C2. La AP consiste en los componentes C3 y diversos factores, tales como el Factor B, el Factor D, la properdina y el Factor H regulador de la fase fluida. La activación del complemento consiste en tres etapas: (a) reconocimiento, (b) activación enzimática, y (c) ataque membranario que conduce a la muerte celular. La primera fase de la activación del complemento por CP comienza con C1. El C1 está compuesto por tres proteínas diferentes: una subunidad de reconocimiento, C1q, y los subcomponentes de serina proteasa, C1r y C1s, que están unidos entre sí en un complejo tetramérico dependiente de calcio, C1r₂s₂. Se necesita un complejo de C1 intacto para que la activación fisiológica de C1 resulte. La activación se produce cuando el complejo de C1 intacto se une a la inmunoglobulina que forma complejo con el antígeno. Esta unión activa a C1s que a continuación escinde a las proteínas C4 y C2 para generar C4a y C4b, así como C2a y C2b. Los fragmentos C4b y C2a se combinan para formar la C3 convertasa, C4b2a, que a su vez escinde C3 para formar C3a y C3b. La activación de la LP se inicia mediante la unión de MBL a determinados azúcares en la superficie diana y desencadena la activación de los Masps que después escinden C4 y C2 de manera análoga a la actividad de C1s de la CP, que resulta en la generación de la C3 convertasa, C4b2a. Por lo tanto, la CP y la LP se activan mediante mecanismos diferentes, pero comparten los

mismos componentes C4 y C2 y ambas vías conducen a la generación de la misma C3 convertasa, C4b2a. La escisión de C3 mediante C4b2a en C3b y C3a es un evento central de la vía del complemento por dos motivos. Inicia el bucle de amplificación de la AP porque el C3b depositados en la superficie es un intermediario central de la AP. Tanto C3a como C3b son biológicamente importantes. C3a es proinflamatorio y junto con C5a se denominan anafilotoxinas. C3b y sus productos de escisión adicionales también se unen a los receptores del complemento presentes en neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos, y facilitan, de esta manera, la fagocitosis y el aclaramiento de las partículas opsonizadas por C3b. Finalmente, C3b se puede asociar con C4b2a para formar la C5 convertasa de la CP y la LP para activar la secuencia de complemento terminal, que conduce a la producción de C5a, un potente mediador proinflamatorio, y el ensamblaje del complejo de ataque membranario lítico (MAC, por sus siglas en inglés), C5-C9.

Debido a que CP y AP tienen un papel esencial en la defensa del hospedante y muchas patologías humanas dependientes del complemento están mediadas por la AP, es deseable inhibir selectivamente la AP en el tratamiento de dichas patologías humanas. Por consiguiente, en métodos preferidos descritos en la presente memoria, se mantiene la inmunidad proporcionada por la CP y la LP, mientras que la AP se inhibe selectivamente. Por lo tanto, en diversas realizaciones, los anticuerpos antipropertina usados en los métodos descritos en la presente memoria, no inhiben la CP y la LP. En ciertos métodos, los anticuerpos antipropertina descritos en la presente memoria son diferentes de los anticuerpos antipropertina desarrollados anteriormente que inhiben la AP y la CP.

Se cree que la AP está constitutivamente activa en un nivel bajo debido a la hidrólisis espontánea de C3 para formar C3(H₂O). C3(H₂O) se comporta como C3b en el sentido de que se puede asociar con fB, lo que vuelve a fB susceptible de escisión y activación de fD. El C3(H₂O)Bb resultante después escinde C3 para producir C3b y C3a e iniciar la cascada de AP al formar la C3 convertasa de la AP, C3bBb. A medida que la C3 convertasa inicial genera cantidades crecientes de C3b, se establece un bucle de amplificación. Cabe señalar que debido a que la CP y la LP también generan C3b, en donde C3b puede unirse al factor B y entablar la AP, el bucle de amplificación de AP también participa en la CP y la LP tras la activación de estas vías. Por lo tanto, la AP consiste en dos entidades funcionales: una vía de activación del complemento independiente que no está relacionada con la CP ni la LP y un proceso de amplificación participa y contribuye a la manifestación completa de la CP y la LP. En una realización, los anticuerpos antipropertina usados en los métodos descritos en la presente memoria inhiben selectivamente el proceso de activación de la AP y no interfieren en el bucle de amplificación de AP de la CP y la LP.

La properdina está estructuralmente compuesta por un dominio en el extremo N y seis dominios de repetición tipo I de (TRS). En condiciones fisiológicas, existe en el plasma como polímeros cíclicos (dímeros, trímeros, tetrámeros), formados por asociaciones de monómeros cabeza a cola. La properdina humana se codifica en el brazo corto del cromosoma X y su deficiencia, especialmente cuando se combina con deficiencia de C2, MBL o IgG2, constituye un factor de riesgo para infecciones por *Neisseria* letales.

Parece que la necesidad de properdina en la iniciación de la AP es variable y depende de la naturaleza de la superficie de activación. A modo de ejemplos no limitantes, la properdina parece ser indispensable para la activación de la AP inducida por LPS y LOS, así como para lesión tisular autóloga mediada por AP, tal como hemólisis extravascular de eritrocitos de ratón con deficiencia de Crry (véase la solicitud de patente estadounidense N.º 2010/0263061).

La properdina es esencial para la lisis de eritrocitos mediada por el complemento de la AP humana en el contexto de la disfunción/bloqueo de fH y DAF (Figura 3).

La properdina es esencial para la lisis en suero autóloga de eritrocitos de PNH (Figura 24). Por otro lado, la deficiencia de properdina altera moderadamente la activación de AP inducida por cimosano y la properdina no parece tener un papel sustancial en la amplificación de AP desencadenada por C5b y CP (véase la solicitud de patente estadounidense N.º 2010/0263061). La activación de AP en una superficie dada puede representar el equilibrio entre la promoción dependiente de properdina a través de la estabilización de C3bBb y la inhibición dependiente del factor H (fH) del «tick-over» de C3. Un activador de la AP para el cual la properdina no es esencial puede tener interacción limitada con fH y, como resultado de carecer de inhibición suficiente dependiente de fH, se puede producir la activación y amplificación espontánea de C3 como un proceso por defecto sin la ayuda de la properdina. Por consiguiente, según se describe en la presente memoria, la inhibición de la función de la properdina mediante los anticuerpos antipropertina de la invención ofrece varias ventajas, que incluyen: no comprometer el bucle de amplificación de AP de la CP y la LP, dejar estas vías completamente activas para la defensa del hospedante; no eliminar completamente la activación del complemento por AP dado que no todos los activadores de la AP (es decir, los patógenos) requieren properdina para desencadenar esta vía, reducir el grado de alteración de la defensa del hospedante en comparación con otros métodos de inhibición de la AP tales como anticuerpos anti-fB y anti-fD.

En una realización, la actividad de la AP que se inhibe usando un método descrito en la presente memoria es activación de la AP inducida por al menos uno del grupo seleccionado de lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés), lipooligosacárido (LOS, por sus siglas en inglés), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por

sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMP, por sus siglas en inglés). En otra realización, la actividad de la AP que se inhibe usando un método de la invención es la generación del complejo proteico C3bBb. En otra realización, la actividad de la AP que se inhibe usando un método de la invención es dependiente de properdina.

- 5 Algunos de los métodos descritos en la presente memoria preservan la capacidad del individuo de combatir una infección a través de la CP y la LP. En la presente memoria se describe un método para inhibir la activación de AP inducida por lipooligosacárido (LOS) bacteriano en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo un anticuerpo antiproperdina e inhibir, de esta manera, una activación de AP inducida por LOS bacteriano en un individuo. En la presente memoria se proporciona un método para inhibir la activación de AP inducida por un LPS bacteriano. En ciertas realizaciones, la activación de AP se induce por LPS de *S. typhosa* y los inhibidores usados en los métodos proporcionados en la presente memoria no inhiben la actividad de AP inducida por LPS de *S. minnesota* o LPS de *E. coli*. En diversas realizaciones, los anticuerpos antiproperdina de la invención inhiben selectivamente la AP, pero no inhiben la activación del complemento desencadenada por CP, la activación del complemento desencadenada por LP, la activación inducida por cimosano ni la activación inducida por veneno de cobra.

En la presente memoria se describe un método para inhibir la activación de AP mediada por el patrón molecular asociado a un patógeno en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo un anticuerpo antiproperdina e inhibir, de esta manera, una activación de AP mediada por PAMP en un individuo. Los ejemplos de PAMP cuya activación de la AP se pueden inhibir mediante los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, un dipéptido de muramilo (MDP, por sus siglas en inglés), un motivo CpG de ADN bacteriano, ARN víricos bicatenarios, un peptidoglucano, un ácido lipoteicoico, una proteína A de superficie externa de *Borrelia burgdorferi*, una lipoproteína-2 activadora de macrófago micoplasmático sintética, tripalmitoil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina (P3CSK4), un dipalmitoil-CSK4 (P2-CSK4), un monopalmitoil-CSK4 (PCSK4), anfotericina B, un polipéptido bacteriano triacilado o diacilado y combinaciones de estos.

- 25 En la presente memoria se describe un método para inhibir el inicio de la activación de AP en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo un anticuerpo antiproperdina e inhibir, de esta manera, el inicio de la activación de AP en un individuo. En otra realización, se proporciona en la presente memoria un método para inhibir la amplificación de la activación de AP en un individuo, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo un anticuerpo antiproperdina e inhibir, de esta manera, la amplificación de la activación de AP en un individuo. Los ejemplos de estas realizaciones son pacientes con PNH que padecen hemólisis mediada por complemento de AP e individuos que padecen aHUS, asma, lesión por isquemia/reperfusión, artritis reumatoide y enfermedades renales mediadas por ANCA mediadas por complemento de AP.

Las enfermedades y trastornos que se pueden tratar usando las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, hemólisis mediada por el complemento de AP, aHUS, asma, lesión por isquemia/reperfusión, artritis reumatoide y enfermedades renales mediadas por ANCA mediadas por complemento de AP.

- En la presente se describen métodos para identificar un posible anticuerpo que tiene efectos inhibidores en la AP, que comprende las etapas de: a) administrar el anticuerpo antiproperdina a un individuo; b) medir el fenotipo resultante del individuo; y c) comparar el fenotipo resultante del individuo con el fenotipo de un animal con inactivación de properdina^{-/-} (véase la solicitud de patente estadounidense N.º 2010/0263061). En otra realización, el anticuerpo antiproperdina usado en los métodos proporcionados en la presente memoria se identifica mediante el método de seleccionar un posible compuesto terapéutico usando el animal con inactivación de properdina^{-/-} (véase la solicitud de patente estadounidense N.º 2010/0263061).

En la presente memoria se describen métodos para identificar un posible anticuerpo antiproperdina que tiene efectos inhibidores sobre la AP. Uno de dichos métodos incluye las etapas de: a) recubrir una placa con lipopolisacárido (LPS); b) lavar la placa para retirar el LPS no unido; c) agregar soroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés); d) lavar la placa para retirar la BSA no unida; e) agregar una mezcla de un compuesto de anticuerpo antiproperdina candidato mezclado con suero humano; f) lavar la placa; g) agregar anticuerpo anti-C3 humano; h) lavar la placa para retirar el anticuerpo no unido; i) agregar el reactivo de sustrato TMB; j) agregar ácido sulfúrico para detener la reacción; k) medir la densidad óptica a 450 nm; l) comparar la densidad óptica de la placa que contiene el compuesto de anticuerpo antiproperdina candidato con la densidad óptica de un testigo comparativo positivo y un testigo comparativo negativo; en donde cuando la densidad óptica está disminuida en comparación con el testigo comparativo positivo, se identifica un anticuerpo antiproperdina.

Anticuerpos antiproperdina

- 55 En la presente memoria se describen composiciones que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a properdina. En una realización, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo policlonal. En otra realización, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina es un

anticuerpo quimérico. En realizaciones adicionales, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo humanizado. En realizaciones preferidas, la properdina es properdina humana.

En una realización, el anticuerpo antiproperdina comprende todas las CDR del grupo que consiste en: VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; VH-CDR3: SEQ ID NO:5; VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; y VL-CDR3: SEQ ID NO:10.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otras realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7. En otra realización, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo monoclonal designado mAb 19.1. El anticuerpo antiproperdina monoclonal designado mAb 19.1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina monoclonal designado mAb 19.1 está humanizado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina se une a un epítipo que comprende al menos un aminoácido de TSR5 (SEQ ID NO:60). En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina de la invención se une específicamente a un epítipo que comprende al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos RGRGCRGRKFDGHRGAGQQDIRHCYSIQHCP (SEQ ID NO:52). En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina que se une específicamente a un epítipo que comprende al menos un aminoácido de la SEQ ID NO:52 es el mAb designado mAb 19.1. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo que compite por la unión con el anticuerpo designado mAb 19.1. En diversas realizaciones, el epítipo al cual el anticuerpo de la invención se puede unir es un epítipo lineal o un epítipo conformacional.

En otras realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena pesada humanizada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena pesada humanizada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena ligera humanizada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47. En otras realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47. En realizaciones adicionales, el anticuerpo antiproperdina es un anticuerpo que compite por la unión con el anticuerpo humanizado descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena pesada quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y una región constante de cadena pesada humana, tal como, a modo de ejemplo no limitante, una región constante de IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:63. En otras realizaciones, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena ligera quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región constante de cadena ligera humana, tal como, a modo de ejemplo no limitante, una región constante de cadena ligera kappa humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:64. En una cierta realización, el anticuerpo antiproperdina comprende una cadena pesada quimérica que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:63 y una cadena ligera quimérica que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:64.

Ensayos de barrido

También se describen en la presente memoria diversos ensayos de barrido que incluyen determinar si un anticuerpo antiproperdina candidato puede inhibir la AP.

En algunos ensayos, el nivel de la actividad de AP en presencia del anticuerpo antiproperdina candidato se compara con la actividad de AP detectada en un testigo comparativo positivo. El testigo comparativo positivo comprende activación de AP en ausencia de compuesto de prueba agregado. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiproperdina candidato se identifica como un inhibidor de la AP cuando la actividad de AP en presencia del anticuerpo antiproperdina candidato es menor que aproximadamente 70 % de la actividad de AP detectada en un testigo comparativo positivo; esto corresponde a más de aproximadamente 30 % de inhibición de la actividad de AP en presencia del compuesto de prueba. En otros ensayos, el anticuerpo antiproperdina candidato se identifica como un inhibidor de la AP cuando la actividad de AP en presencia del anticuerpo antiproperdina candidato es menor que aproximadamente 80 % de la actividad de AP detectada en un testigo comparativo positivo; esto corresponde a más de aproximadamente 20 % de inhibición de la actividad de AP en presencia del compuesto de prueba. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo antiproperdina candidato se identifica como un inhibidor de la AP cuando la actividad de AP en presencia del anticuerpo antiproperdina candidato es menor que aproximadamente 90 % de la actividad de AP detectada en un testigo comparativo positivo; esto corresponde a más de aproximadamente 10 % de

inhibición de la actividad de AP en presencia del compuesto de prueba. En algunas realizaciones, el nivel de la inhibición de AP mediante el anticuerpo antipropedina candidato se compara con el nivel de inhibición detectado en un testigo comparativo negativo.

- 5 Una variedad de formatos de inmunoensayos, incluidos formatos de inmunoensayos competitivos y no competitivos, ensayos de captura de antígeno, ensayos tipo sandwich con dos anticuerpos y ensayos tipo sandwich con tres anticuerpos son métodos útiles de la invención (Self et al., 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7:60-65).

10 También se describen ensayos hemolíticos en la presente memoria. En diversos ensayos, se obtienen eritrocitos (RBC) de individuos normales (sanos) o de individuos que exhiben signos o síntomas de una enfermedad o trastorno, tal como, por ejemplo, PNH. En diversas realizaciones, los RBC se lisan con 5 % a 75 % de suero humano normal (NHS) en presencia de un fragmento de fH recombinante que comprende la repetición de proteína de control de complemento (CCP, por sus siglas en inglés) 19 y 20 de fH (fH19-20, 5-50 μ M) y anticuerpos neutralizantes anti-DAF (3-20 μ g/ml). En algunos ensayos, los RBC de individuos que exhiben signos o síntomas de una enfermedad o trastorno, tal como PNH, se lisan con suero acidificado. En algunos ensayos, se llevan a cabo ensayos hemolíticos en tampón GVB++-Mg++-EGTA para permitir sola la activación del complemento por AP, pero el experto en la técnica entenderá que se pueden usar otros tampones adecuados, siempre que el tampón permita solo la activación del complemento por AP. En una realización, el grado de lisis se calcula al medir la OD410 del sobrenadante de la mezcla de incubación, como una medida de la liberación de hemoglobina en la disolución. En diversos ensayos, se agrega al menos un anticuerpo antipropedina, a una concentración de aproximadamente 1 μ g/ml a aproximadamente 50 μ g/ml, y se preincuba con suero, y se mide la extensión de la inhibición de la hemólisis de los RBC.

25 Los enzimoanálisis de adsorción (ELISA, por sus siglas en inglés) son también útiles en los métodos descritos en la presente memoria. Una enzima tal como, pero sin limitarse a, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o ureasa se puede enlazar, por ejemplo, a un anticuerpo anti-C3 o un anticuerpo secundario para su uso en un método descritos en la presente memoria. Se puede usar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromógeno tetrametilbencidina (TMB, por sus siglas en inglés), que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Otros sistemas relacionados con enzimas convenientes incluyen, por ejemplo, el sistema de detección de fosfatasa alcalina, que se puede usar con el sustrato cromógeno p-nitrofenil fosfato para proporcionar un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, se puede usar un sistema de detección de beta-galactosidasa con el sustrato cromógeno o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG, por sus siglas en inglés) para proporcionar un producto soluble fácilmente detectable a 410 nm. Alternativamente, se puede usar un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como púrpura de urea-bromocresol (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Se pueden obtener anticuerpos primarios y secundarios ligados en enzimas útiles de cualquier cantidad de fuentes comerciales.

- 35 La detección quimioluminiscente es también útil para detectar la inhibición de la AP. Se pueden obtener anticuerpos secundarios quimioluminiscentes ligados en enzimas útiles de cualquier cantidad de fuentes comerciales.

La detección fluorescente es también útil para detectar la inhibición de la AP. Los fluorocromos útiles incluyen, pero no se limitan a, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo de Texas y anticuerpos etiquetados con lisamina-Fluoresceína o rodamina.

- 40 Los radioinmunoanálisis (RIA, por sus siglas en inglés) son también útiles en los métodos descritos en la presente memoria. Dichos ensayos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Brophy et al. (1990, Biochem. Biophys. Res. Comm. 167:898-903) y Guehot et al. (1996, Clin. Chem. 42:558-563). Los radioinmunoanálisis se llevan a cabo, por ejemplo, usando anticuerpo primario o secundario etiquetado con yodo-125 (Harlow et al., supra, 1999).

- 45 Se analiza una señal emitida desde un anticuerpo detectable, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromógeno; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección del yodo-125; o un fluorómetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz a una cierta longitud de onda. Cuando se usa un ensayo ligado a enzima, se lleva a cabo un análisis cuantitativo usando un espectrofotómetro. Se entiende que los ensayos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo manualmente o, si se desea, se pueden automatizar, y que la señal emitida desde múltiples muestras se puede detectar simultáneamente en muchos sistemas disponibles comercialmente.

- 55 Los métodos descritos en la presente memoria también abarcan el uso de inmunoanálisis basados en electroforesis capilar (CEIA, por sus siglas en inglés), que se puede automatizar, si se desea. Los inmunoanálisis también se pueden usar junto con fluorescencia inducida por láser, según se describe, por ejemplo, en Schmalzing et al. (1997, Electrophoresis 18:2184-2193) y Bao (1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 699:463-480). Los inmunoanálisis con liposoma, tales como inmunoanálisis con liposoma con inyección de flujo e inmunosensores de liposomas, también

se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria (Rongen et al., 1997, J. Immunol. Methods 204:105-133).

La transferencia western cuantitativa también se puede usar para determinar el nivel de inhibición de AP en los métodos descritos en la presente memoria. Las transferencias Western se cuantifican usando métodos conocidos tales como densitometría de barrido (Parra et al., 1998, J. Vase. Surg. 28:669-675).

Métodos de administración

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo antiproperdina a un individuo identificado como que padece una patología mediada por AP. En un método preferido, el individuo es un mamífero que tiene un sistema de AP. En un método más preferido, el individuo es un humano.

Un método descrito en la presente memoria comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo antiproperdina a un individuo, en donde una composición de la presente invención que comprende un anticuerpo antiproperdina, o una combinación de estos, se usa sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. El anticuerpo se puede usar en combinación con otras modalidades de tratamiento tales como, por ejemplo, terapias antiinflamatorias y similares. Los ejemplos de terapias antiinflamatorias que se pueden usar en combinación con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, terapias que emplean fármacos esteroides, así como terapias que emplean fármacos no esteroides.

Composiciones farmacéuticas y terapias

La administración de un anticuerpo antiproperdina en un método de tratamiento, según se describe en la presente memoria, se puede lograr de varios modos diferentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por lo tanto, los métodos terapéuticos y profilácticos descritos en la presente memoria abarcan el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo antiproperdina. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día. Un método descrito en la presente memoria contempla la administración de una dosis que resulta en una concentración del anticuerpo antiproperdina de entre 1 μ M y 10 μ M en un individuo. Otro método contempla la administración de una dosis que resulta en una concentración del anticuerpo antiproperdina de la presente invención de entre 1 μ M y 10 μ M en el plasma de un individuo.

Típicamente, las dosificaciones que se puede administrar en un método descrito en la presente memoria a un animal, preferiblemente, un humano, varían en cantidad de 0,5 μ g a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del animal. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de cualquier cantidad de factores que incluyen, pero no se limitan a, el tipo de animal y el tipo de estado de enfermedad que se está tratando, la edad del animal y la vía de administración. Preferiblemente, la dosificación del compuesto variará de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal del animal. Más preferiblemente, la dosificación variará de aproximadamente 3 μ g a aproximadamente 1 mg por kilogramo de peso corporal del animal.

El compuesto se puede administrar a un animal tan frecuentemente como varias veces al día, o se puede administrar menos frecuentemente, tal como una vez por día, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez por mes o incluso menos frecuentemente, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será claramente evidente para el experto y dependerá de cualquier cantidad de factores tales como, pero sin limitarse a, el tipo y gravedad de la enfermedad que se está tratando, el tipo y edad del animal, etc. Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado de aquí en adelante en la técnica de la farmacología. En general, dichos métodos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un portador o uno o más ingredientes accesorios distintos y luego, si es necesario o deseable, dar forma o envasar el producto en una unidad de dosis simple o múltiple deseada.

Aunque la descripción de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se dirige principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para administración ética a humanos, el experto entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para administración a animales de todas clases. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a humanos con el fin de obtener composiciones adecuadas para administración a diversos animales se entiende bien y el farmacólogo veterinario con experiencia puede diseñar y llevar a cabo dicha modificación con experimentación meramente común, si la hiciese. Los individuos para los cuales se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, humanos y otros primates, mamíferos incluidos mamíferos comercialmente relevantes tales como primates no humanos, ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o vender en formulaciones adecuadas para administración oftálmica, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, bucal y vías de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposómicas, eritrocitos resellados que contiene el ingrediente activo y formulaciones de base inmunológica.

- 5 Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender a granel, como una dosificación unitaria simple o como una pluralidad de dosificaciones unitarias simples. Una dosificación unitaria es una cantidad diferenciada de composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada de ingrediente activo. La cantidad de ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un individuo o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosificación.

Las cantidades relativas de ingrediente activo, el portador farmacéuticamente aceptable y cualesquiera ingredientes adicionales en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y afección del individuo tratado y dependerán, además, de la vía por la cual se administra la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1 % y 100 % (p/p) de ingrediente activo.

- 15 Además del ingrediente activo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender, además, uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales.

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención pueden elaborarse usando tecnología convencional.

- 20 La administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la rotura física de un tejido de un individuo y la administración de la composición farmacéutica a través de la rotura en el tejido. Por lo tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra el tejido y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limite a, inyección intravenosa, intraocular, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal e intratumoral.

- 25 Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral comprenden el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o disolución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender en una forma adecuada para administración por bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en contenedores con múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables. Dichas formulaciones pueden comprender, además, uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. En una realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir polvo o granulado) para reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril sin pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

- 30 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o vender en forma de una suspensión o disolución acuosa u oleosa estéril inyectable. Esta suspensión o disolución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida y puede comprender además del ingrediente activo, ingredientes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en la presente memoria. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar usando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, disolución de Ringer, disolución de cloruro de sodio isotónica y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de sistemas poliméricos biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero moderadamente soluble o una sal moderadamente soluble.

- 35 40 45 50 55 Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7 nanómetros y, preferiblemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nanómetros. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para administración usando un dispositivo que comprende un reservorio de polvo seco al cual se puede dirigir una corriente de propelente para dispersar el polvo o usando un contenedor dispensador de disolvente/polvo autopropelente tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo disuelto o suspendido en un propelente de baja ebullición en un contenedor sellado.

Preferiblemente, dichos polvos comprenden partículas en donde al menos 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 0,5 nanómetros y al menos 95 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 7 nanómetros. Más preferiblemente, al menos 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 1 nanómetro y al menos 90 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 6 nanómetros. Las composiciones en polvo secas preferiblemente incluyen un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosificación.

Los propelentes de baja ebullición generalmente incluyen propelentes líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propelente puede constituir 50 a 99,9 % (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir 0,1 a 20 % (p/p) de la composición. El propelente puede comprender, además, ingredientes adicionales tales como un tensioactivo líquido no iónico o sólido aniónico o un diluyente sólido (preferiblemente que tiene un tamaño de partículas del mismo orden que las partículas que comprenden el ingrediente activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para suministro pulmonar también pueden proporcionar el ingrediente activo en forma de gotas de una disolución o suspensión. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender como disoluciones o suspensiones alcohólicas acuosas o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el ingrediente activo y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender, además, uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, un agente saborizante tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tampón, un agente tensioactivo o un conservante tal como metilhidroxibenzoato. Las gotas proporcionadas mediante esta vía de administración preferiblemente tienen un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros.

Las formulaciones descritas en la presente memoria como útiles para suministro pulmonar son también útiles para suministro intranasal de una composición farmacéutica de la invención.

Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra del modo en que se toma rapé, es decir, mediante una inhalación rápida a través del pasaje nasal desde un contenedor del polvo que se sujeta cerca de las narinas.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal pueden comprender, por ejemplo, de aproximadamente tan poco como 0,1 % (p/p) y tanto como 100 % (p/p) de ingrediente activo, y pueden comprender, además, uno o más ingredientes adicionales descritos en la presente memoria.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender una formulación adecuada para administración bucal. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos o grageas elaboradas usando métodos convencionales y pueden, por ejemplo, 0,1 a 20 % (p/p) de ingrediente activo, el resto comprende una composición que se puede disolver o degradar oralmente y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente memoria. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una disolución o suspensión aerosolizada o atomizada que comprende el ingrediente activo. Dichas formulaciones en polvo, aerosolizadas o atomizadas, cuando se dispersan, tienen preferiblemente un tamaño de partícula o gota promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros, y pueden comprender, además, uno o más ingredientes adicionales descritos en la presente memoria.

Según se usa en la presente memoria, «ingredientes adicionales» incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y desintegración; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros «ingredientes adicionales» que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Ratón con properdina humana

En la presente memoria también se describe un ratón transgénico que expresa properdina humana y no expresa properdina de ratón. Para crear un ratón transgénico, se puede incorporar un ácido nucleico que codifica la proteína properdina humana en un vector de expresión recombinante en una forma adecuada para la expresión de la proteína properdina humana en una célula hospedante. El término «en una forma adecuada para expresión de la proteína de fusión en una célula hospedante» pretende significar que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras enlazadas operativamente con el ácido nucleico que codifica la proteína

properdina humana de una manera que permite la transcripción del ácido nucleico en ARNm y la traducción del ARNm en la proteína properdina humana. El término «secuencia reguladora» está reconocido en la técnica y se pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras son conocidas para los expertos en la técnica y se describen en 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. Se entenderá que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante que se va a transfectar y/o la cantidad de proteína properdina humana que se va a expresar.

Se puede crear un ratón transgénico, por ejemplo, al introducir un ácido nucleico que codifica la proteína properdina humana (típicamente enlazada con elementos reguladores adecuados, tales como un potenciador constitutivo o específico para tejido) en el oocito, p. ej., mediante microinyección y dejar que el oocito se desarrolle en un ratón de acogida hembra. También se pueden incluir secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgén para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núms. 4.736.866 y 4.870.009 y 1986, Hogan et al., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory. Un ratón fundador transgénico se puede usar para reproducir animales adicionales que portan el transgén. Los ratones transgénicos que portan un transgén que codifica la proteína properdina de la invención se pueden reproducir adicionalmente con otros ratones transgénicos que portan otros transgenes, o con otros ratones inactivados, p. ej., un ratón inactivado que expresa el gen de properdina murina, tales como los descritos en la solicitud de patente estadounidense N.º 2010/0263061). Se entenderá que además de los ratones transgénicos, el sistema descrito en la presente memoria se puede usar para generar otros animales que expresan la properdina humana.

El ratón transgénico descrito en la presente memoria puede expresar properdina humana de un promotor de β -actina de pollo con el potenciador CVM-IE, pero el experto en la técnica entenderá que el ratón transgénico descrito en la presente memoria abarca la expresión de properdina humana de otros promotores y potenciadores. Los ejemplos de promotores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, promotor de ADN pol II, promotor de PGK, promotor de ubiquitina, promotor de albúmina, promotor de globina, promotor de ovoalbúmina, promotor inicial de SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), LTR retroviral y LTR lentiviral. Los sistemas de expresión promotores y potenciadores útiles también incluyen sistemas de expresión inducibles y/o específicos de tejido.

En algunos casos, la properdina humana se insertó en el genoma de ratón que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:67 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54.

Kits

También se describe en la presente memoria un kit que comprende un anticuerpo antiproperdina, o combinaciones de estos, según se describen en la presente memoria y un material instructivo que describe, por ejemplo, la administración del anticuerpo antiproperdina, o combinaciones de estos, a un individuo como un tratamiento terapéutico como un uso distinto de tratamiento, según se describe en otra parte en la presente memoria. En una realización, este kit comprende, además, un portador (preferiblemente estéril) farmacéuticamente aceptable adecuado para disolver o suspender la composición terapéutica, que comprende un anticuerpo antiproperdina, o combinaciones de estos, según se describe en la presente memoria, por ejemplo, antes de la administración del anticuerpo a un individuo. Opcionalmente, el kit comprende un aplicador para administrar el anticuerpo.

Ejemplos experimentales

La invención se describe a continuación en referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo a efectos de ilustración y la invención no debe interpretarse de ningún modo como limitada por estos Ejemplos, sino que debe interpretarse como que abarca todas y cualesquiera variaciones evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria.

Sin descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, mediante el uso de la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, elaborar y utilizar los compuestos descritos en la presente memoria y poner en práctica los métodos reivindicados.

Ejemplo 1

Se generaron anticuerpos monoclonales antiproperdina humana usando el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al. (1975, Nature, 256:495) con algunas modificaciones. Se inmunizaron intraperitonealmente ratones con inactivación de properdina ($fP^{-/-}$) (8 semanas) con 50 μ g (en 100 μ l de PBS) de properdina humana purificada (CompTech Inc) emulsionada con 100 μ l de adyuvante Titermax (de Sigma). El día 14 y el día 21, los ratones se inmunizaron nuevamente con 50 μ g de properdina humana purificada emulsionada con adyuvante Titermax. Una semana después, los ratones se examinaron para determinar el título de antiproperdina en suero. Los ratones con un título de anticuerpo de 1:10 000 o más alto se usaron para experimentos de fusión de hibridoma. Dos

días antes del experimento de fusión, los ratones se volvieron a inyectar (i.p) con 50 µg de properdina humana purificada (en 100 µl de PBS). Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se aisló el bazo para la preparación de la suspensión de célula simple mediante ruptura mecánica. La suspensión de células de bazo se lavó una vez con HYB-SFM (Invitrogen) + medio de FBS al 10 % y se contaron las células, y se mezclaron con células de mieloma X63-Ag8.653 (ATCC) en una relación 2:1. La mezcla de células se volvió a lavar con medio HYB-SFM y el sedimento celular se preparó mediante centrifugación (1000 rpm x 5 min). El sedimento celular se rompió y soltó suavemente y a continuación se indujo la fusión celular lentamente mediante la adición de polietilenglicol (PEG 1500) (1,5 ml PEG para 3×10^8 células). Las células se dejaron durante 1 min a 37 °C y a continuación se agregaron 20 ml de medio HYB-SFM a las células en 3 min (1 ml durante el primer min, 3 ml durante el segundo min y 16 ml durante el tercer min). La mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min y las células se colocaron en placas usando placas de 24 pocillos en medio HAT (10ml HAT [Sigma H0262], 5ml Pen/estrep, 500 µl de Gentamicina y FBS al 10 % en 500 ml de medio HYB-SFM). Después de 2 semanas, se extrajeron los sobrenadantes de los pocillos con colonias visibles para barrido de reactividad con properdina humana purificada mediante ELISA. Los clones positivos se recogieron y colocaron en placas usando placas de 96 pocillos mediante el método de dilución limitante para obtener clones simples después del barrido de segunda pasada mediante ELISA. Los clones positivos se expandieron en medio HT (10ml de HT, 5ml de Pen/estrep, 500 µl de Gentamicina y FBS al 10 % en 500 ml de medio HYB-SFM). Antes de recoger el anticuerpo, las células de hibridoma se cambiaron a un medio sin suero (HYB-SFM) durante 2-3 días. El medio de cultivo celular se recogió para la purificación del mAb mediante cromatografía de afinidad por proteína G.

Para clonar los ADNc de los mAb antiproperdina, se aislaron ARN totales de las células de hibridoma mediante el reactivo TRizol (Sigma). Los ADNc de primera hebra se sintetizaron mediante transcripción inversa usando el cebador Oligo(dT). Para amplificar el ADNc de cadena pesada (para IgG1, TgG2a/b), se usaron los siguientes cebadores en las reacciones de PCR: 5'-GAGGTGAAGCTGGTGGAG(T/A)C(T/A)GG-3' (SEQ ID NO:68) y 5'-GGGGCCAGTGGATAGAC-3' (SEQ ID NO:69). Para amplificar la cadena ligera k, se usaron los siguientes cebadores: mezcla de 4 cebadores corriente arriba: 5'-CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGACTCCA-3' (SEQ ID NO:70); 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO:71); 5'-CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO:72); 5'-CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO:73); cebador corriente abajo: 5'-GTTGGTGCAGCATCAGC-3' (SEQ ID NO:74). Los amplicones de PCR se clonaron en el vector pCR TOPO TA 2.1 vector (Invitrogen) y se secuenciaron. Para obtener la secuencia de péptido señal (líder) de los mAb, se usó el método 5'-RACE con un kit (GeneRacer) de Invitrogen. Los ADNc de región variable completos se amplificaron usando cebadores específicos determinados a partir de 5'-RACE y los datos de secuenciación iniciales.

Ejemplo 2

Se examinó la inhibición dependiente de la dosis de la activación del complemento por AP inducida por LPS mediante el mAb 19.1, 22.1, 25 y 30. Los 4 clones de mAb inhibieron eficazmente la activación del complemento por AP cuando se agregaron a suero humano normal (NHS) al 50 % en una concentración final de 5 µg/ml (véase la Figura 2). Se recubrieron placas para ELISA (96 pocillos, Nunc) con 50 µl de disolución de LPS (40 µg/ml en disolución salina tamponada con fosfato [PBS]) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (PBS-T) y se agregaron 50 µl de suero humano normal (NHS) al 50 % que se había incubado con 1-5 µg/ml de mAb antiproperdina durante 1 hora a 4 °C. El NHS se diluyó con GVB-EGTA-Mg++ (que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg++). La placa se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora, se lavó 3 x con PBS-T y después se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-C3 humano de cabra conjugado con HRP (1:4000, Cappel) y la placa se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con PBS-T y después se desarrolló usando el reactivo BD Pharmingen A+B. La reacción se detuvo después de 5 min con 2 N H₂SO₄. La activación del complemento por AP se detectó al medir la cantidad de depósito de C3 sobre la placa (OD₄₅₀). Una muestra con EDTA agregado (NHSEDTA) sirvió como testigo negativo (EDTA bloquea la activación del complemento). Una muestra sin mAb agregado (0 Ab) sirvió como la activación de complemento por AP inicial.

Ejemplo 3

Se llevaron a cabo experimentos que demuestran que los mAb antiproperdina humana inhiben la lisis de eritrocitos (RBC) humanos causada por la disfunción de fH y DAF (véase la Figura 3). Se incubaron RBC humanos normales (5×10^6 células) a 37°C durante 20 min con 100 µl de NHS al 50 % (diluido con GVB-EGTA-Mg++ que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg++) en presencia de 30 µM de fH 19-20 recombinante y 7,5 µg de anti-DAF humano de ratón (de AbD Serotec) (2006, Ferreira et al., J Immunol. 177:6308-6316). La reacción de lisis se detuvo mediante la adición de 200 µl de EDTA helado 20 µM en PBS. Las mezclas de incubación se centrifugaron durante 5 min a 1500 g y el sobrenadante se recogió y se midió para OD₄₂₀ nm. Antes de la adición de los RBC, el NHS se preincubó con 0 o 5 µg/ml de anticuerpos antiproperdina durante 1 hora a 4°C. Las muestras sin NHS o fH19-20 agregado o con EDTA agregado se usaron como testigos de lisis negativos y una muestra de RBC lisados completamente con 100 µl de agua destilada se usó como testigo positivo (100 % de lisis) con respecto al cual se normalizó el % de lisis en otras muestras.

Ejemplo 4

Experimentos que evalúan RBC de oveja sensibilizados a anticuerpo incubados con suero humano normal al 50 % (NHS) en ausencia o presencia de 5 µg/ml de mAb antiproperdina (véase la Figura 4). Se incubaron RBC de oveja sensibilizados a anticuerpo (5×10^6 células, de CompTech Inc) a 37 °C durante 20 min con 100 µl de NHS al 50 % (diluido con tampón GVB++). Antes de la adición de los RBC de oveja, el NHS se preincubó con 0 o 5 µg/ml de anticuerpo antiproperdina durante 1 hora a 4°C. La reacción de lisis se detuvo mediante la adición de 200 µl de EDTA helado 20 mM en PBS. Las mezclas de incubación se centrifugaron durante 5 min a 1500 g y el sobrenadante se recogió y se midió para OD420 nm. Las muestras sin NHS o con EDTA agregado se usaron como testigos de lisis negativos y una muestra de RBC de oveja lisados completamente con 100 µl de agua destilada se usó como testigo positivo (100 % de lisis) con respecto al cual se normalizó el % de lisis en otras muestras.

Ejemplo 5

Generación de mutantes de eliminación de properdina humana y confirmación mediante transferencia Western de su expresión en células CHO (véase la Figura 5). La properdina humana (fP) está compuesta por 7 dominios de repetición de tromboespondina (TSR) que se enumeran de 0 a 6. Se eliminaron los dominios TDR individuales 0 a 5 (véanse las SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 y 60) mediante PCR inversa (1989, Hemsley et al., Nucleic Acid.5 Res. 17:6545) usando ADNc de properdina humana de longitud completa (SEQ ID NO:67) en el vector pCMV (de Origene) como plantilla. Para eliminar TSR 6 (SEQ ID NO:61) o TSR 5-6, se usaron métodos de PCR normales y posteriormente clonación en un vector de expresión (se usó el vector pCAGGS). Los mutantes de eliminación se transfectaron en células CHO usando reactivo Lipofectamine (Invitrogen) en placas de 6 pocillos en medio Optimem. Después de 48 horas, las células se lisaron con 50 mM de Tris-HCL, pH 7,4 que contenía 150 mM de NaCl, glicerol al 10 %, 1mM de EDTA y un cóctel de inhibidor de proteasa (Roche) y Triton X-100 al 1 % (250 µl por pocillo). El lisado se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y se determinó la concentración proteica mediante el método de ensayo de proteína BCA. Se usaron aproximadamente 100 µg de proteína total de cada muestra para el análisis SDS-PAGE.

Ejemplo 6

Se llevaron a cabo ensayos ELISA tipo sandwich de la unión del mAb 19.1 y 25 a los mutantes de eliminación de la properdina humana para mapear el epítipo del mAb 19.1 y 25 (véase la Figura 6). Se recubrieron placas para ELISA con 50 µl de 2 µg/ml del mAb implicado durante toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3 x con PBS-T y después se agregaron 25 µg (en 50 µl de PBS que contenía BSA al 1 %) de proteínas de lisado de células CHO a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 x con PBS-T y después se detectó la proteína capturada mediante el anticuerpo antiproperdina humana de cabra biotinilado y el sistema HRP-avidina. Un tercer mAb 29.3 que se une a un epítipo diferente de 19.1 y 25 se usó como testigo para confirmar la expresión proteica mutante.

Ejemplo 7

El mapeo de epítipos mostró el epítipo de mAb 19.1 mapeado en la mitad del extremo C de TSR5 con la secuencia de aminoácidos: RGRTCRGRKFDGHRACAGQQQDIRHCYSIQHCP (SEQ ID NO:52) (véase la Figura 7). Se generaron tres mutantes de properdina humana que comprendían TSR0-4 + ¼ TSR5, TSR0-4 + ½ TSR5 o TSR0-4 + ¾ TSR5 mediante PCR convencional. Se clonaron en pCAGGS y se expresaron en células CHO, según se describe en el Ejemplo 5. La expresión proteica se confirmó mediante análisis Western usando el anticuerpo antiproperdina humana de cabra. La mancha se dividió y resonó con un anticuerpo anti-etiqueta His de ratón (Qiagen) para confirmar que está presente la etiqueta His en el extremo C (sin proteólisis del extremo C). Se llevaron a cabo ensayos ELISA tipo sandwich para determinar la reactividad con el mAb 19.1 según se describe en el Ejemplo 6. El mAb 29.3 que se une a un epítipo diferente de 19.1 se usó como testigo para confirmar la expresión proteica mutante.

Ejemplo 8

El mapeo de epítipos mostró el epítipo de mAb 25 mapeado en el segmento del cuarto del extremo C de TSR6 con la secuencia de aminoácidos: LVVEEKRPCLHVPACKDPEEEEL (SEQ ID NO:53) (véase la Figura 8). Se generaron tres mutantes de properdina humana que comprendían TSR0-5 + ¼ TSR6, TSR0-5 + ½ TSR6 o TSR0-5 + ¾ TSR6 mediante PCR convencional. Se clonaron en pCAGGS y se expresaron en células CHO, según se describe en el Ejemplo 5. La expresión proteica se confirmó mediante análisis Western usando el anticuerpo antiproperdina humana de cabra. La mancha se dividió y resonó con un anticuerpo anti-etiqueta His de ratón (Qiagen) para confirmar que está presente la etiqueta His en el extremo C (sin proteólisis del extremo C). Se llevaron a cabo ensayos ELISA tipo sandwich para determinar la reactividad con el mAb 25 según se describe en el Ejemplo 6. El mAb 19.1 que se une a un epítipo diferente de 25 se usó como testigo para confirmar la expresión proteica mutante. El mapeo de epítipos también mostró que el epítipo del mAb 25 depende de dos residuos de cisteína en TSR6 (SEQ ID NO: 61, que se muestran en la Figura 5B). Estos son cisteína 62 (C62) y cisteína 78 (C78) de TSR6. La mutación simple a Alanina (A) de C62 o C78 en la properdina humana de longitud completa no suprimió la

capacidad de unión al mAb 25, pero mutaciones dobles de C62A y C78A suprimieron la unión a mAb 25. Como testigo positivo de la expresión proteica mutante, el mAb 19.1 exhibió reactividad para todas las muestras. Este resultado sugiere que C78 dentro del segmento del último cuarto de TSR6 (con la secuencia designada por SEQ ID NO:53), así como C62 que se ubica fuera de la SEQ ID NO:53, pero dentro de TSR6 (SEQ ID NO: 61), constituyen dos residuos esenciales del epítipo del mAb 25. Los ensayos de unión de los mAb 19.1 y 25 se llevaron a cabo en placas ELISA usando homogenados de células CHO transfectadas. HuP se refiere a células CHO transfectadas con fP humana de longitud completa (intacta) como testigo positivo; Con se refiere a células CHO no transfectadas como testigos negativos para la unión. Las otras muestras de células CHO transfectadas con ADNc de fP humana mutante contenían mutaciones de C62A y C78A simples o dobles.

Ejemplo 9

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la expresión de mAb 19.1 quimérico y humanizado recombinantes en células CHO (véase la Figura 17). El ADNc de cadena pesada de 19.1 quimérico se construyó mediante la clonación de la región variable del mAb 19.1 (SEQ ID NO:1) en el vector pFUSE-CHlg-hG4 (de InvivoGen, que contenía la región constante de cadena pesada de IgG4 humana, con Serina 229 mutada a Prolina) usando los sitios EcoRI/NheI. El ADNc de cadena ligera de 19.1 quimérico se construyó mediante la clonación de la región variable del mAb 19.1 (SEQ ID NO:6) en el vector pFUSE2-CLlg-hk (de InvivoGen, que contenía la región constante de cadena ligera k humana) usando los sitios Agel/BsiWI. Los ADNc de cadena pesada de 19.1 humanizado se construyeron mediante la clonación de la región variable de cadena pesada humanizada de 19.1 (ADNc que codifican SEQ ID NO:42 y SEQ ID NO:44, sintetizados mediante Genescript) en el vector pFUSE-CHlg-hG4 (de InvivoGen, que contenía la región constante de cadena pesada de IgG4 humana, con Serina 229 mutada a Prolina) usando los sitios EcoRI/NheI. El ADNc de cadena ligera de 19.1 humanizado se construyó mediante la clonación de la región variable de cadena ligera humanizada de 19.1 (ADNc que codifica la SEQ ID NO:47, sintetizada mediante Genescript) en el vector pFUSE2-CLlg-hk (de InvivoGen, que contenía la región constante de cadena ligera k humana) usando los sitios Agel/BsiWI. Las células CHO se cotransfectaron con cadenas pesada y ligera quiméricas de 19.1 o cadenas pesada y ligera humanizadas de 19.1 (las dos cadenas pesadas humanizadas se aparearon con la misma cadena ligera humanizada) usando reactivo Lipofectamine. Después la transfección, las células CHO se seleccionaron con Geocine (1 mg/ml) y Blastcidine (10 µg/ml) durante aproximadamente 7 días. Las colonias celulares resistentes al fármaco se recogieron, tripsinizaron y sometieron a cultivo de dilución limitado en placas de 96 pocillos en presencia de los mismos fármacos de selección. Después de que las células se volvieron confluentes en las placas de 96 pocillos, el medio se sometió a prueba para determinar la reactividad con properdina humana mediante ELISA y los clones positivos se expandieron. Para la producción del anticuerpo, se cultivaron líneas estables de células CHO transfectadas en DMEM: medio F12 con FBS al 10 % en matraces de cultivo de 150 cm y después de alcanzar la confluencia, se cambiaron a medio CD-CHO sin suero (Invitrogen). Después de 3 días, el medio se recogió y los mAb se purificaron mediante cromatografía con proteína G. Las alícuotas de los mAb purificados se analizaron mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 10

Se llevaron a cabo experimentos para medir las afinidades de unión por antígeno de los mAb 19.1, mAb 19.1 quimérico, mAb 19.1 humanizado, mAb 25, mAb 22.1 y mAb 30 (véanse las Figuras 18 y 19). Se usó análisis de resonancia en plasmones superficiales para medir la tasa constante de asociación y disociación para la unión del mAb antiproperdina humana con la properdina humana inmovilizada usando el instrumento BIAcore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Los experimentos de Biacore se llevaron a cabo a 25 °C. La matriz de dextrano carboxilado de un chip sensor CM4 se usó para acoplar la properdina humana purificada mediante química de acoplamiento de amina para obtener la densidad superficial 200RU. Los mAb se diluyeron hasta 150, 75, 35,5, 17,75, 8,87 y 0 nM en tampón HBSET (disolución salina tamponada con HEPES con EDTA y Tween 20) y las muestras se inyectaron en la superficie de properdina a 30 µl/min (inyección de 60 µl) durante 120 s y se dejó proceder la disociación del analito unido durante 900 s. Los datos se analizaron mediante el programa informático de evaluación BIA 3.2 asumiendo un modelo de unión bivalente. La regeneración de la superficie se logró con una inyección de 50 µl (50µl/min) de 50 mM de NaOH.

Ejemplo 11

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y dos 19.1 humanizados en el bloqueo de la activación del complemento por AP humana inducida por LPS (véase la Figura 20). Se recubrieron placas para ELISA (96 pocillos, Nunc) con 50 µl de disolución de LPS (40 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4 °C). Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con PBS que contenía 0,05 % de PBS-T y se agregaron 50 µl de NHS al 50 % que se había incubado con 0, 5, 10 o 20 µg/ml de mAb antiproperdina durante 1 hora a 4 °C. El NHS se diluyó con GVB-EGTA-Mg++ (que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg++). La placa se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora, se lavó 3 x con PBS-T y después se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-C3 humano de cabra conjugado con HRP (1:4000, Cappel) y la placa se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con PBS-T y después se desarrolló usando el reactivo BD Pharmingen A+B. La reacción se detuvo después de 5 min con 2 N H2SO4. La activación del complemento por AP se detectó al

medir la cantidad de depósito de C3 sobre la placa (OD450). Una muestra con EDTA agregado (NHSEDTA) sirvió como testigo negativo (EDTA bloquea la activación del complemento). Una muestra sin mAb agregado (NHS) sirvió como la activación de complemento por AP inicial.

Ejemplo 12

- 5 Se llevaron a cabo experimentos para evaluar las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y dos 19.1 humanizados en el bloqueo de la lisis de RBC humanos mediante el complemento AP humano en el contexto de la disfunción de fH y DAF (véase la Figura 21). Se incubaron RBC humanos normales (5×10^6 células) a 37 °C durante 20 min con 100 µl de NHS al 50 % (diluido con GVB-EGTA-Mg⁺⁺ que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg⁺⁺) en presencia de 30 µM de fH 19-20 recombinante y 7,5 µg de anti-DAF humano de ratón (de AbD Serotec) (2006, Ferreira et al., J Immunol. 177:6308-6316). Antes de la adición de los RBC, el NHS se preincubó con 1-15 µg/ml de diversos mAb antipropedina durante 1 hora a 4 °C. La reacción de lisis se detuvo mediante la adición de 200 µl de EDTA helado 20 mM en PBS. Las mezclas de incubación se centrifugaron durante 5 min a 1500 g y el sobrenadante se recogió y se midió para OD420 nm. Las muestras sin NHS o fH19-20 agregado o con EDTA agregado se usaron como testigos de lisis negativos y una muestra de RBC lisados completamente con 100 µl de agua destilada se usó como testigo positivo (100 % de lisis) con respecto al cual se normalizó el % de lisis en otras muestras.

Ejemplo 13

- 20 Se llevaron a cabo experimentos para evaluar las actividades relativas de los mAb 19.1, 19.1 quimérico y dos 19.1 humanizados en el bloqueo de la activación del complemento por AP de mono Resus y mono cangrejero inducida por LPS (véanse las Figuras 22 y 23). Se recubrieron placas para ELISA (96 pocillos, Nunc) con 50 µl de disolución de LPS (40 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4 °C). Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con PBS que contenía 0,05 % de PBS-T y se agregaron 50 µl de suero de mono Resus normal (NRS) o suero de mono cangrejero normal (NCS) al 50 % que se había incubado con 0, 10, 20, 30 o 40 µg/ml de mAb antipropedina durante 1 hora a 4 °C. El NRS o NCS se diluyó con GVB-EGTA-Mg⁺⁺ (que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg⁺⁺). La placa se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora, se lavó 3 x con PBS-T y después se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-C3 humano de cabra conjugado con HRP (1:4000, Cappel, que hace reacción cruzada con C3 de mono) y la placa se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con PBS-T y después se desarrolló usando el reactivo BD Pharmingen A+B. La reacción se detuvo después de 5 min con 2 N H₂SO₄. La activación del complemento por AP se detectó al medir la cantidad de depósito de C3 sobre la placa (OD450). Una muestra con EDTA agregado (NRSEDTA o NCSEDTA) sirvió como testigo negativo (EDTA bloquea la activación del complemento). Una muestra sin mAb agregado (NRS o NCS) sirvió como la activación de complemento por AP inicial.

Ejemplo 14

- 35 Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la inhibición de la lisis en suero acidificado de eritrocitos de PNH (prueba de Ham) mediante el mAb 19.1, 25 y 19.1-459 humanizado (véase la Figura 24). Los RBC de pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) se sometieron a la prueba de suero acidificado de Ham en presencia o ausencia de mAb. Los RBC se incubaron con suero autólogo (concentración final de 83 %) a 37 °C durante 2 horas y se calculó el porcentaje de lisis al medir la OD405 del sobrenadante, normalizada con respecto a una muestra de RBC completamente lisada mediante agua destilada (Eh DDW). La mezcla de incubación estaba compuesta por lo siguiente: 240 µl de suero, 25 µl de HCL 1/6 (o 25 µl de disolución salina para los testigos negativos), 12,5 µl de suspensión de RBC al 50 % (v/v), 10 µl de mAb en disolución salina. Se usó una muestra de RBC incubados con suero autólogo no acidificado (NHS) como testigo negativo (lisis de fondo). En la ausencia de mAb, aproximadamente el 50 % de los RBC se lisaron mediante el suero acidificado. Esta lisis se inhibió completamente mediante el mAb 19.1 a 8 µg/ml y concentración mayor, mediante un mAb 19.1 humanizado (n.º 459) a la concentración de 20 µg/ml y mediante el mAb 25 a la concentración de 8 µg/ml y mayor.

Ejemplo 15

- 50 Se generó un ratón humanizado con properdina de la siguiente manera (véase la Figura 25). Se construyó un vector de expresión de fP humana en el plásmido pACGGS según se ilustra en el esquema de la Figura 25A, usando el promotor β-actina de pollo con potenciador CVM-IE y la cola poliA de β-globina de conejo para la expresión estable del ADNc en células eucariotas. La secuencia de ADNc de properdina humana y su secuencia proteica codificada usadas para construir el vector de expresión se muestran en las SEQ ID NO:67 y SEQ ID NO:68. El plásmido se linealizó mediante digestión con enzima de restricción y se microinyectó en los cigotos de ratones C57BL/6 para producir los ratones fundadores transgénicos con fP humana. Mediante barrido por PCR (usando cebadores específicos para fP humana 5'- ATCAGAGGCCTGTGACACC-3' (SEQ ID NO:65) and 5'-CTG CCCTTGAGCTCCTCA-3' (SEQ ID NO:66) y ADN genómicos aislados de las colas de ratón) se pueden identificar ratones fundadores positivos (que exhiben un fragmento de ADNc de fP humana de aproximadamente 800 bp). De 40 ratones analizados, cinco (núms. 15, 20, 24, 27 y 32) eran positivos (Figura 25B, flechas rojas). Se llevaron a

cabo ensayos ELISA tipo sandwich para detectar la fP humana en los ratones positivos transgénicos (Figura 25C). Se recubrió una placa con mAb no bloqueante contra fP humana (clon 8.1). Después de la incubación con suero de ratón diluido (10 %), la fP humana se detectó mediante ELISA usando un anticuerpo anti-fP humana de cabra conjugado con HRP. El suero humano normal (NHS) se usó como testigo positivo. Mediante este método, la fP humana debería detectarse en NHS y en los sueros de ratones positivos transgénicos (p. ej. 15, 20, 24, 27, 32), pero no en el suero de ratón normal (es decir, no transgénico, p. ej. 29) o de ratón fP^{-/-}. Los ratones fundadores positivos transgénicos a continuación se reprodujeron con ratones naturales para estabilizar la transmisión de la línea germinal. El barrido de los ratones F1 a partir de dicho apareamiento se logró mediante PCR del ADN de la cola para detectar el transgén y mediante ELISA tipo sandwich para detectar la properdina humana en sus sueros, según se describió anteriormente. Después de confirmar la transmisión de la línea germinal, los ratones fundadores se reprodujeron con ratones fP^{-/-} para generar ratones fP^{-/-}-transgén de fP humana +. La restauración de la actividad del complemento por AP en ratones fP^{-/-}-transgén de fP humana se evaluó mediante ensayos de activación por AP inducidos por LPS, según se describe en el Ejemplo 2. En este ensayo, la actividad de complemento por AP debería detectarse en el suero de ratón natural y en el suero de ratones fP^{-/-} que son positivos para el transgén de fP humana, pero no en el suero de ratones fP^{-/-}. En este ensayo, el suero de ratón natural tratado con EDTA se usará como testigo negativo para la activación del complemento por AP.

Ejemplo 16

Se llevaron a cabo experimentos para examinar la actividad in vivo y la cinética del mAb 25 en ratones «humanizados con properdina» (Figura 26). Se inyectó a un ratón humanizado con properdina (fP^{-/-}-transgén de fP humana +) 0,5 mg (i.p.) de mAb 25. Se recogieron muestras de sangre (50-75 µl) antes de la inyección (0 hr) y después en diversos puntos de tiempo después de la inyección mediante sangrado retroorbital y se prepararon los sueros. Las muestras de suero se sometieron a prueba para determinar la activación del complemento por AP inducida por LPS. Para este ensayo, se recubrieron placas para ELISA (96 pocillos, Nunc) con 50 µl de disolución de LPS (40 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4 °C). Al día siguiente, las placas se lavaron 3x con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (PBS-T) y se agregaron 50 µl de suero de ratón diluido en serie (comenzando desde 1:10) a cada pocillo. El suero de ratón se diluyó con GVB-EGTA-Mg++ (que contenía una concentración final de 10 mM de EGTA y 2,5mM de Mg++). La placa se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora, se lavó 3 x con PBS-T y después se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-C3 murino de conejo conjugado con HRP (1:2000, Cappel) y la placa se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3x con PBS-T y después se desarrolló usando el reactivo BD Pharmingen A+B. La reacción se detuvo después de 5 min con 2 N H2SO4. La activación del complemento por AP se detectó al medir la cantidad de depósito de C3 sobre la placa (OD450). En este ejemplo ilustrado, no había presencia de actividad de complemento por AP en el suero del ratón fP^{-/-} ni en el suero natural tratado con EDTA. En cambio, se detectó actividad de complemento por AP en el suero natural y en el suero del ratón humanizado con fP en el tiempo 0 hr (antes del tratamiento con mAb 25). La actividad por complemento de AP en el ratón humanizado permaneció suprimida a las 8, 24 y 48 horas después del tratamiento con el mAb 25, pero se volvió detectable a las 72, 96 y 120 horas. Estos resultados demuestran que a una dosificación de 0,5 mg/ratón, el mAb 25 fue capaz de inhibir la actividad de complemento por AP in vivo durante al menos 48 horas.

Ejemplo 17

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar el efecto del mAb 19.1 antiproperdina humana en la hemólisis extravascular (EVH). En este modelo de EVH, los ratones humanizados con properdina (n=4 por grupo experimental) recibieron transfusión de eritrocitos (RBC) de ratones con triple inactivación Crry/DAF/C3 (TKO, por sus siglas en inglés). Los ratones receptores (ratones humanizados con properdina) se trataron 6 horas antes de la transferencia de los RBC con el mAb 19.1 (2 mg/ratón, i.p.) o un mAb de IgG1 de ratón testigo (MOPC, purificado a partir del hibridoma MoPC 31C, de ACTT). Los RBC se cosecharon de los ratones TKO donantes, se lavaron en PBS y se etiquetaron con CFSE antes de la inyección (a través de la vena de la cola) en los ratones receptores, según el procedimiento publicado anteriormente (Miwa et al., 2002, Blood 99: 3707-3716). Cada ratón receptor recibió RBC equivalentes a 100 µl de sangre. A los 5 minutos y 6, 24, 48, 72, 96, 120 horas después de la transfusión de RBC, se extrajo sangre de los ratones receptores y los RBC se analizaron para determinar la cantidad de RBC etiquetados con CFSE (es decir, transfundidos) restantes en la circulación. La cantidad de RBC etiquetados con CFSE en cada receptor se normalizó (como %) con respecto a la detectada en el punto de tiempo de 5 min. En los ratones receptores tratados con la IgG testigo (MOPC), los RBC de TKO se eliminaron rápidamente a través de EVH, congruente con los hallazgos previos (Miwa et al., 2002, Blood 99: 3707-3716). Sin embargo, en ratones receptores tratados con el mAb 19.1 antiproperdina humana, no se produjo EVH y los RBC transfundidos persistieron, lo que demuestra que el mAb antiproperdina fue eficaz en la prevención de la EVH (Figura 27).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> The Trustees of the University of Pennsylvania Song, Wenchao	
	<120> ANTICUERPOS ANTIPROPERDINA Y USOS DE ESTOS	
	<130> 046483-6012-00-WO.601477	
5	<150> US 61/503,900 < 151> 2011-07-01	
	<160> 67	
	<170> PatentIn version 3.5	
10	<210> 1 < 211> 427 < 212> ADN < 213> Mus musculus	
	<400> 1 gagcaaggct gtcttggggc tgctcttctg cctggtgaca ttcccaagct gtgtcctatc	60
	ccagggtgcag ctcaagcagt caggacctgg cctagtgcag cctccacaga gctgttccat	120
	ctctgcaca gtctctgggt tctcattaac tacctatggt gttcactggg ttccccagtc	180
	tccaggaaag ggtctggaat ggctgggagt gatttggagt ggtggagaca cagactataa	240
	tgcctctttc atatccagac tggcctcaa caaggacact tccaagagcc aagttttctt	300
15	taaaatgaac agtctgcaag ctgatgacac agccatttat tactgtgcca gaaataagga	360
	ctattatct aactacgact ttactatgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt	420
	ctctctca	427
20	<210> 2 < 211> 140 < 212> PRT < 213> Mus musculus	

ES 2 701 075 T3

<400> 2

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Gln Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala

65 70 75 80

Ser Phe Ile Ser Arg Leu Arg Ile Asn Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln

85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Tyr Tyr

100 105 110

Cys Ala Arg Asn Lys Asp Tyr Tyr Thr Asn Tyr Asp Phe Thr Met Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

ES 2 701 075 T3

	<210> 3	
	< 211> 10	
	< 212> PRT	
	< 213> Mus musculus	
5	<400> 3	
	Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Val His	
	1 5 10	
	<210> 4	
	< 211> 16	
10	< 212> PRT	
	< 213> Mus musculus	
	<400> 4	
	Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala Ser Phe Ile Ser	
	1 5 10 15	
	<210> 5	
	< 211> 14	
15	< 212> PRT	
	< 213> Mus musculus	
	<400> 5	
	Asn Lys Asp Tyr Tyr Thr Asn Tyr Asp Phe Thr Met Asp Tyr	
	1 5 10	
	<210> 6	
20	< 211> 429	
	< 212> ADN	
	< 213> Mus musculus	
	<400> 6	
25	ggcaggggga tcaagatgga atcacagact caggtcttcc tctccctgct gctctgggta 60	
	tctggtaacct gtgggaacat tatgatgaca cagtcgccat catctctggc tgtgtctgca 120	
	ggaqaaaagg tcaactatgag ctgtaagtc agtcaaagtg ttttatacag ttcaaatcag 180	
	aagaacttct tggcctggta ccagcagaaa ccaggacagt ctctaaact gctgatctac 240	
	tgggcataca ctagggaatc tgggtgcctt gatcgcttca caggcagtgg atctgggaca 300	
	gattttatct ttaagatcaa cagtgtacaa gllgaagacc aggcagttta ttactgtcac 360	
	caatacctct cctcgtaaac gttcgggggg gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat 420	
	gctgcacca 429	

ES 2 701 075 T3

<210> 7
 < 211> 132
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

5

<400> 7
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

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

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Ile Leu Thr Ile Asn Ser Val Gln Val Glu Asp Gln Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

ES 2 701 075 T3

<210> 8
 < 211> 17
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

5 <400> 8
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu
 1 5 10 15

Ala

10 <210> 9
 < 211> 7
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 9
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

15 <210> 10
 < 211> 8
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 10
 His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr
 1 5

20 <210> 11
 < 211> 487
 < 212> ADN
 < 213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> '11
 aacagcatat gatcagtgtc ctctccaaag tccttgaaca tagactctaa ccattggactg 60

 gacctgggtc ttctctcttc tcctgtcagt aactgcaggt gtccactccc aggttcagct 120

 gctgcagttc ggagctgagg tgatgaagcc tggggcctca gtgacctttt cctgcaaggc 180

 tattggttac acattcattg actactggat agagtggata aagcagaggc ctggacatgg 240

 cctlgaglgg attggagaga ttttctctgg aagtgggact attaatcaca atgagaagtt 300

 caaggacaag gccagtttta glgctcattc atctccaaac acagcctaca tgcactcag 360

 cagactgaca agtgaggact ctgcactata ttactgtgca agagagggac tggactattg 420

 gggccaaggc accactctca cagtctcttc agccaaaagc acaccccat ctgtctatcc 480

 actggcc 487

 <210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 12

Met Asp Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ile Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Ile Asp Tyr Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn His Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ser Phe Ser Ala His Ser Ser Ser Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

115 120 125

Leu Thr Val Ser Ser

130

5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

	<400> 13 Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr Trp Ile Glu	
	1 5 10	
5	<210> 14 < 211> 17 < 212> PRT < 213> Mus musculus	
	<400> 14 Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn His Asn Glu Lys Phe Lys	
	1 5 10 15	
	Asp	
10	<210> 15 < 211> 5 < 212> PRT < 213> Mus musculus	
	<400> 15 Glu Gly Leu Asp Tyr	
	1 5	
15	<210> 16 < 211> 420 < 212> ADN < 213> Mus musculus	
	<400> 16 ccaaaattca aagacaaaat ggattttcaa gtgcagattt tcagcttccct gctaatacagt	60
20	gcctcagtea taatatccag aggacaaatt gttctcacc agtctccagc aatcatgtct gcattctcag gggagagggt caccatgacc tgcagtgcc aatcaagtgt aagttatata	120 180
	tactgggtacc agcagaagtc aggcacgtcc cccaaaagat ggatttttga cactccaca	240
	ctggcttctg gactccctac tgccttcagt ggcagtggt ctgggacctc ttaactctctc	300
	acaatcagca gcatggagac tgaagatgct gccacttatt actgccagca gtggagtaga	360
	aaccattca cgttgggttc ggggacaaag ttggaaataa aacgggctga tgcctgcacca	420
25	<210> 17 < 211> 128 < 212> PRT < 213> Mus musculus	

ES 2 701 075 T3

<400> 17

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser

35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser

50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Phe Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Ser Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110

Ser Arg Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile Tyr

10

1 5 10

<210> 19

<211> 7

ES 2 701 075 T3

< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 19
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

5 <210> 20
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 20
Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Phe Thr

10 1 5

<210> 21
< 211> 464
< 212> ADN
< 213> Mus musculus

15 <400> 21
gaqcatggct gtcttggggc tgcctttctg cctgggtgaca ttccaagct gtgtcctatc 60
ccagggtgcag ctgaagcagt caggacctgg cctagtgcag ccctcacaga gctgtccat 120

cacctgcaca gtctctgggt tctcattaac tagctatggt gtacactggg ttgcgcagtc 180

tccaggaaaag ggtctggagt ggctgggagt gatatggagt ggtggaagca cagactataa 240

tgcagctttc atatccagac tgagcatcag caaagacact tccaagagcc aagttttctt 300

taaaatgaac agtctgcaac ctgatgacac agccatatat tactglgcca gaaataaaga 360

cttctatagt aactacgact atactatgga actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg 420

tctcctcagc caaaaagaca ccccatctg tctatccact ggcc 464

20 <210> 22
< 211> 141
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 22

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

35 40 45

Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala

65 70 75 80

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln

85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Asn Tyr Asp Tyr Thr Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 23
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
 1 5 10

5
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
 1 5 10 15

10
 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25
 Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Asn Tyr Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10

15
 <210> 26
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 26
 atggaatcac agactcaggt cttcctctcc ctgtctctct gggatctctg tacctgtggg 60
 aacattatga tganacagtc gccatcattt ttggtctgtg ctgcaggaga aaaggctcact 120
 ttgagctgta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa cttcttgccc 180
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
 gaatctggly tccolgalcg cttcacaggc agtggatctg ggacagalll tactottacc 300
 atcagcagly tacaagctga agacctggca gtttattact gtcaltcaata cctctctctg 360
 20 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacggg ctgalgctgc acca 414

<210> 27
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 27

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala

20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys

130

5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 29

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 30

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 30

His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr

1 5

<210> 31

< 211> 451

< 212> ADN

< 213> Mus musculus

<400> 31

atggaattga tctgggtctt tctctcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt caactctgag 60

gtccagcttc agcagictgg agttgagctg gtgaggcctg ggtcctcagt gaagatgtcc 120

tgcaagaactt ctggatatac attyacagcc tacgggtataa actgggtgaa gcagaggcct 180

ggacaggggc tgcaatggat tggatatatt tatattggaa atgggtatac tgactacaat 240

gagaagttca agggcaagge cacactgact tcagacacat cctcagcac agcctacatg 300

cagctcagca gcctggcctc tgaggactct gcaatctatt tctgtcaaga tgggggtggg 360

acgaggacta tgctatggac ttctgggggc aaggaaacctc agtcaccgto tctcagcca 420

aaacaacagc cccatcggto tatccatggc c 451

<210> 32
 < 211> 139
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

5

<220>
 < 221> misc_feature
 < 222> (48)..(48)
 < 223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

<400> 32
 Met Glu Leu Ile Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Xaa

10

35 40 45

ES 2 701 075 T3

Thr Ala Tyr Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Trp Asp Glu Asp Tyr Ala Met Asp Phe
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

5
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

<400> 33
Gly Tyr Thr Xaa Thr Ala Tyr Gly Ile Asn
1 5 10

15
<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 34

Tyr Ile Tyr Ile Gly Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Ser Gly Trp Asp Glu Asp Tyr Ala Met Asp Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 399

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 36

atgagtgtgc ccactcaggt cctqgggttg ctgctgctgt ggcctacagg tggcagatgt 60

gacalccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcac ctgtgggaga aactgicacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaataattac agttatttag catggatatca gcagaaacag 180

agaaaatctc ctacccctct ggtctatcat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgacatca 240

aggllcagtg gcagtggatc aggcacacag tttctctga aqatccacag cctgcagcct 300

gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat cattatggtc ctctccacac gtctgggtctg 360

gggacaaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcacca 399

<210> 37

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 37

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Gly Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Lys Ser Pro

50 55 60

His Leu Leu Val Tyr His Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Thr Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile His

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr

100 105 110

Gly Pro Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

5

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

10

1 5 10

<210> 39

<211> 7

ES 2 701 075 T3

< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 39
His Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1 5

5
<210> 40
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 40
Gln His His Tyr Gly Pro Pro Pro Thr

10 1 5

<210> 41
< 211> 116
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

15
<400> 41
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

ES 2 701 075 T3

Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg
115

<210> 42
<211> 141
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

ES 2 701 075 T3

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala
65 70 75 80

Ser Phe Ile Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Lys Asp Tyr Tyr Thr Asn Tyr Asp Phe Thr Met
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 43
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg

5

<210> 44

<211> 141

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 44

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu

35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Trp Ser Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Ala

65 70 75 80

Ser Phe Ile Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Lys Asp Tyr Tyr Thr Asn Tyr Asp Phe Thr Met

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

5

<210> 45

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr

85 90 95

Ser Thr Pro

5

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10

1 5 10

<210> 47

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 47

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala

20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys

130

5

<210> 48

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg

5

<210> 49

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 49

Met Asp Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Ile Asp Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Thr Ile Asn His Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

115 120 125

Val Thr Val Ser Ser

130

5

<210> 50

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 50

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

Asn Trp Pro

115

5

<210> 51

<211> 126

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 51

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser

35 40 45

Val Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg

100 105 110

Asn Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

115 120 125

5

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 701 075 T3

<400> 52

Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly Arg Lys Phe Asp Gly His Arg Cys Ala

1 5 10 15

Gly Gln Gln Gln Asp Ile Arg His Cys Tyr Ser Ile Gln His Cys Pro

20 25 30

<210> 53

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 53

Leu Val Val Glu Glu Lys Arg Pro Cys Leu His Val Pro Ala Cys Lys

1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Glu Glu Leu

20

<210> 54

< 211> 469

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 54

Met Ile Thr Glu Gly Ala Gln Ala Pro Arg Leu Leu Leu Pro Pro Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser Asp Pro Val Leu Cys

20 25 30

Phe Thr Gln Tyr Glu Glu Ser Ser Gly Lys Cys Lys Gly Leu Leu Gly

35 40 45

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

50 55 60

Gln Lys Arg Ser Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys Arg Ser Pro Arg Trp

65 70 75 80

Ser Leu Trp Ser Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr Cys Ser Glu Gly

85 90 95

Ser Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn Gly Gln Cys Ser

100 105 110

ES 2 701 075 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Pro Glu Pro Ser Gln Lys Pro Pro Gly Lys Pro Cys Pro Gly

ES 2 701 075 T3

225 230 235 240

Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys Pro Val

245 250 255

Ala Gly Gly Trp Gly Pro Trp Gly Pro Val Ser Pro Cys Pro Val Thr

260 265 270

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

275 280 285

Pro Gln His Gly Gly Pro Phe Cys Ala Gly Asp Ala Thr Arg Thr His

290 295 300

Ile Cys Asn Thr Ala Val Pro Cys Pro Val Asp Gly Glu Trp Asp Ser

305 310 315 320

Trp Gly Glu Trp Ser Pro Cys Ile Arg Arg Asn Met Lys Ser Ile Ser

325 330 335

Cys Gln Glu Ile Pro Gly Gln Gln Ser Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly

340 345 350

ES 2 701 075 T3

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

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

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

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

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

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

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

Glu Glu Glu Glu Leu
465

<210> 55
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 55

Asp Pro Val Leu Cys Phe Thr Gln Tyr Glu Glu Ser Ser Gly Lys Cys

1 5 10 15

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Gly Val Ser Val Glu Asp Cys Cys Leu Asn

20 25 30

Thr Ala Phe Ala Tyr Gln Lys Arg Ser Gly Gly Leu Cys Gln Pro Cys

35 40 45

<210> 56

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ser Pro Arg Trp Ser Leu Trp Ser Thr Trp Ala Pro Cys Ser Val Thr

1 5 10 15

Cys Ser Glu Gly Ser Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Cys Val Gly Trp Asn

20 25 30

Gly Gln Cys Ser Gly Lys Val Ala Pro Gly Thr Leu Glu Trp Gln Leu

35 40 45

Gln Ala Cys Glu Asp Gln Gln Cys Cys Pro

50 55

<210> 57

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 57

Glu Met Gly Gly Trp Ser Gly Trp Gly Pro Trp Glu Pro Cys Ser Val

1 5 10 15

Thr Cys Ser Lys Gly Thr Arg Thr Arg Arg Arg Ala Cys Asn His Pro

20 25 30

Ala Pro Lys Cys Gly Gly His Cys Pro Gly Gln Ala Gln Glu Ser Glu

35 40 45

Ala Cys Asp Thr Gln Gln Val Cys Pro

50 55

5

<210> 58

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Thr His Gly Ala Trp Ala Thr Trp Gly Pro Trp Thr Pro Cys Ser Ala

1 5 10 15

Ser Cys His Gly Gly Pro His Glu Pro Lys Glu Thr Arg Ser Arg Lys

20 25 30

Cys Ser Ala Pro Glu Pro Ser Gln Lys Pro Pro Gly Lys Pro Cys Pro

35 40 45

Gly Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Arg Cys Thr Gly Leu Pro Pro Cys Pro

10

50 55 60

<210> 59

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 59

Val Ala Gly Gly Trp Gly Pro Trp Gly Pro Val Ser Pro Cys Pro Val

1 5 10 15

.

Thr Cys Gly Leu Gly Gln Thr Met Glu Gln Arg Thr Cys Asn His Pro

20 25 30

Val Pro Gln His Gly Gly Pro Phe Cys Ala Gly Asp Ala Thr Arg Thr

35 40 45

His Ile Cys Asn Thr Ala Val Pro Cys Pro

50 55

<210> 60

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Asp Gly Glu Trp Asp Ser Trp Gly Glu Trp Ser Pro Cys Ile Arg

1 5 10 15

Arg Asn Met Lys Ser Ile Ser Cys Gln Glu Ile Pro Gly Gln Gln Ser

20 25 30

Arg Gly Arg Thr Cys Arg Gly Arg Lys Phe Asp Gly His Arg Cys Ala

35 40 45

Gly Gln Gln Gln Asp Ile Arg His Cys Tyr Ser Ile Gln His Cys Pro

50 55 60

<210> 61

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 61

Leu Lys Gly Ser Trp Ser Glu Trp Ser Thr Trp Gly Leu Cys Met Pro

1 5 10 15

Pro Cys Gly Pro Asn Pro Thr Arg Ala Arg Gln Arg Leu Cys Thr Pro

20 25 30

Leu Leu Pro Lys Tyr Pro Pro Thr Val Ser Met Val Glu Gly Gln Gly

35 40 45

Glu Lys Asn Val Thr Phe Trp Gly Arg Pro Leu Pro Arg Cys Glu Glu

50 55 60

Leu Gln Gly Gln Lys Leu Val Val Glu Glu Lys Arg Pro Cys Leu His

65 70 75 80

Val Pro Ala Cys Lys Asp Pro Glu Glu Glu Glu Leu

85 90

5

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

10

1 5 10

<210> 63

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 63

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

ES 2 701 075 T3

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

ES 2 701 075 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 64
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 701 075 T3

<400> 64

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

5

<210> 65

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 65

atcagaggcc tgtgacacc 19

<210> 66

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 66

ctgcccttgt agctcctca 19

<210> 67

<211> 1603

ES 2 701 075 T3

< 212> ADN
< 213> Homo sapiens

<400>

67

5

tatcaaccca gataaagcgg gacctcctct ctggtagagg tgcagggggc agtactcaac	60
atgatacacag agggagcgca ggccccctga ttgttgcctc cgcgcctgct cctgctgctc	120
accctgccag ccacaggcct agaccccgct ctctgcttca ccagtatga agaatectcc	180
ggcaagtga agggcctcct ggggggtggt gtcagcgtgg aagactgctg tctcaacct	240
gcctttgcct accagaaacg tagtggtggg ctctgtcagc cttgcaggtc cccacgatgg	300
tccctttggt ccacatgggc cccctgttcg gtgacgtgct ctgagggcct ccagctggcg	360
taccggcgct gtgtgggctg gaatgggcag tgccttgaa aggtggcacc tgggacctg	420
gagtggcagc tccaggcctg tgaggaccag cagtgctgct ctgagatggg cggctggtct	480
ggctgggggc cctgggagcc ttgctctgct acctgctcca aagggacctg gacccgcagg	540
cgagcctgta atcacctgc tcccaagtgt gggggccact gccaggaca ggcacaggaa	600
tcagaggcct gtgacacca gcaggtctgc cccacacag gggcctgggc cactggggc	660
ccctggaccc cctgctcagc ctctgcccac ggtggacccc acgaacctaa ggagacacga	720
agccgcaagt gttctgcacc tgagccctcc cagaaacctc ctgggaagcc ctgcccgggg	780
ctagcctacg agcagcggag gtgcaccggc ctgccacct gccagtggc tgggggctgg	840
gggccttggg gccctgtgag cccctgccct gtgacctgtg gcctgggcca gaccatggaa	900
caacggacgt gcaatcacc ttgtccccag catgggggccc ccttctgtgc tggcgatgcc	960

ES 2 701 075 T3

acccggaccc acatctgcaa cacagctgtg cctgcccctg tggatgggga gtgggactcg	1020
tggggggagt ggagcccctg tatccgacgg aacatgaagt ccatcagctg tcaagaaatc	1080
ccgggcccagc agtcacggcg gaggacctgc aggggcccga agtttgacgg acatcgatgt	1140
gccgggcaac agcaggatal ccggcactgc tacagcatcc agcactgccc cttgaaagga	1200
tcattggtcag agtggagtag ctgggggctg tgcattgccc cctgtggacc taatctacc	1260
cgtgcccgc agcgccctcg cacacccctg ctccccaagt acccgcccac cgtttccatg	1320
gtcgaaggtc agggcgagaa gaacgtgacc ttctggggga gaccgctgcc acggtgtgag	1380
gagctacaag ggcagaagct gggtgtggag gagaacgac catgtctaca cgtgctgtct	1440
tgcaaagacc ctgaggaaga ggaactctaa cacttctctc ctccactctg agccccctga	1500
ccttccaaac ctcaataaac tagcctcttc gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	1603

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo que se une a properdina humana, en donde el anticuerpo comprende:
 - (a) una cadena pesada variable que comprende VH-CDR1: SEQ ID NO:3; VH-CDR2: SEQ ID NO:4; y VH-CDR3: SEQ ID NO:5; y una cadena ligera variable que comprende VL-CDR1: SEQ ID NO:8; VL-CDR2: SEQ ID NO:9; y VL-CDR3: SEQ ID NO:10; o
 - (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7; o
 - (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:42 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47; o
 - (d) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:47.
2. Una composición según se reivindica en la reivindicación 1 (a) o (b), en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:63 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y la SEQ ID NO:64.
3. Una composición según se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que comprende la SEQ ID NO:52.
4. Una composición que comprende un anticuerpo que se une a properdina humana y compite con la unión del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a properdina.
5. Una composición que comprende un anticuerpo, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una patología mediada por la vía alternativa (AP), en donde la patología se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular, lesión por isquemia-reperfusión, artritis, artritis reumatoide, síndrome de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), asma, sepsis en trasplante de órgano, inflamación, glomerulonefritis, lupus y combinaciones de estas.
6. Una composición que comprende un anticuerpo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo antipropredina inhibe selectivamente la vía alternativa, pero no inhibe la vía clásica ni la vía de lectina.
7. Una composición que comprende un anticuerpo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo antipropredina no afecta el bucle de amplificación de AP la vía clásica ni de la vía de lectina.
8. Una composición que comprende un anticuerpo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo antipropredina inhibe la generación de una proteína C3bBb.

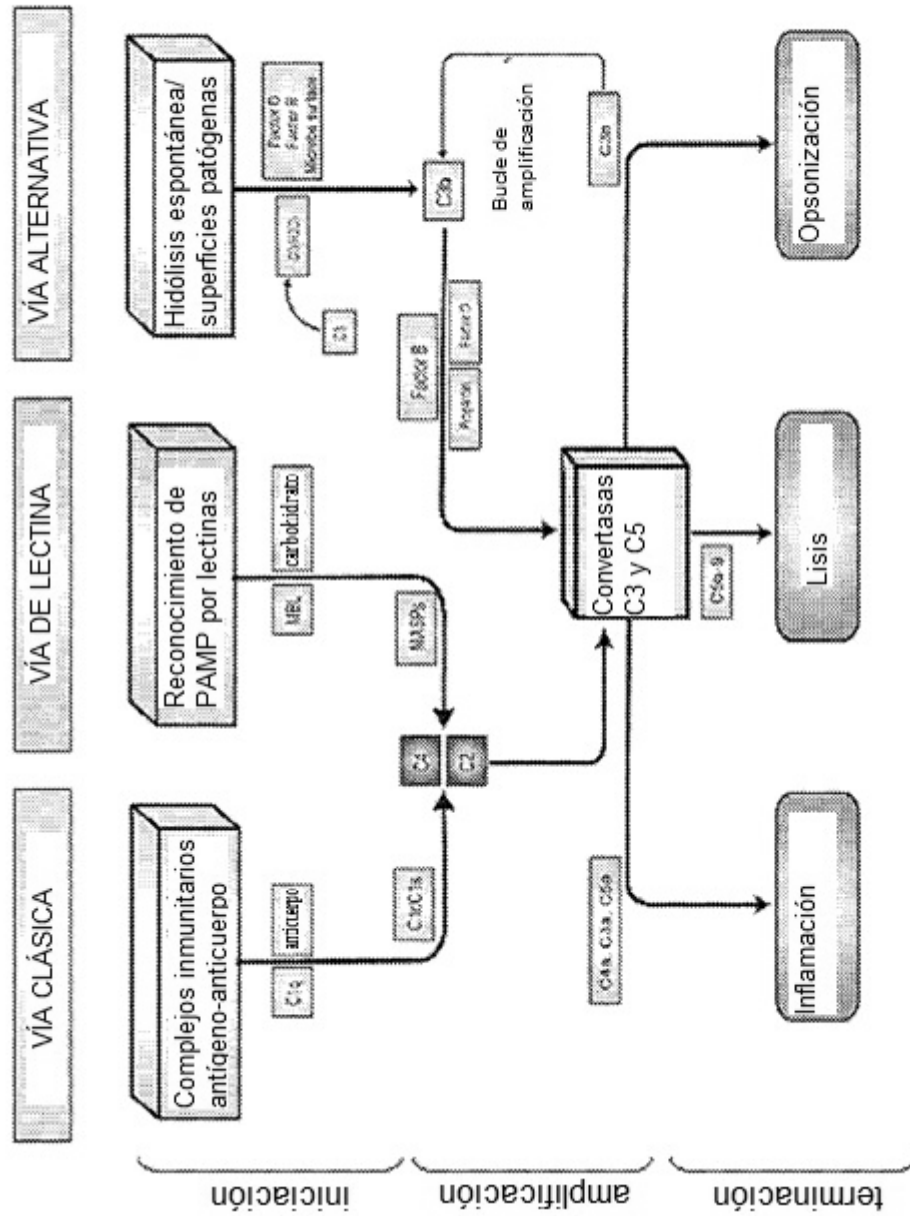


Figura 1

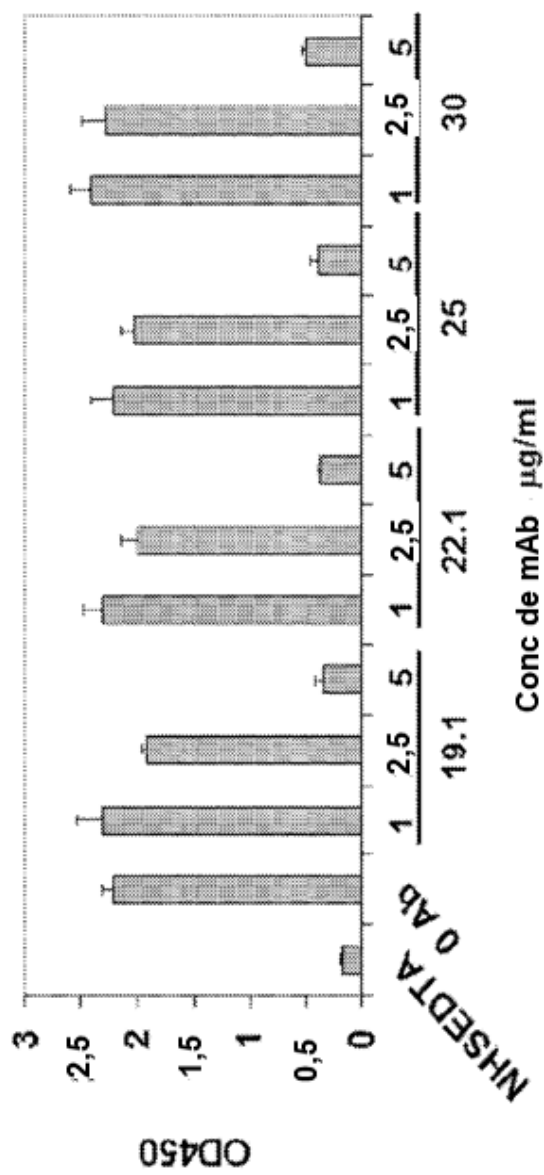


Figura 2

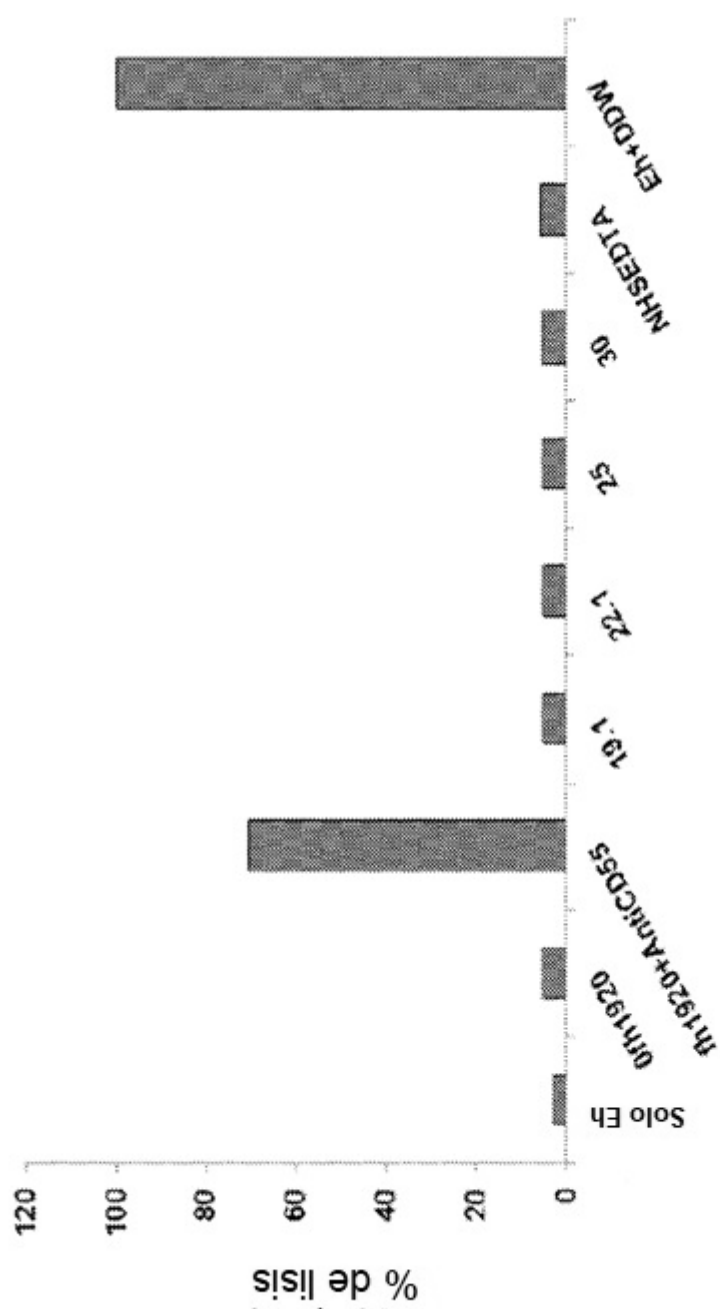


Figura 3

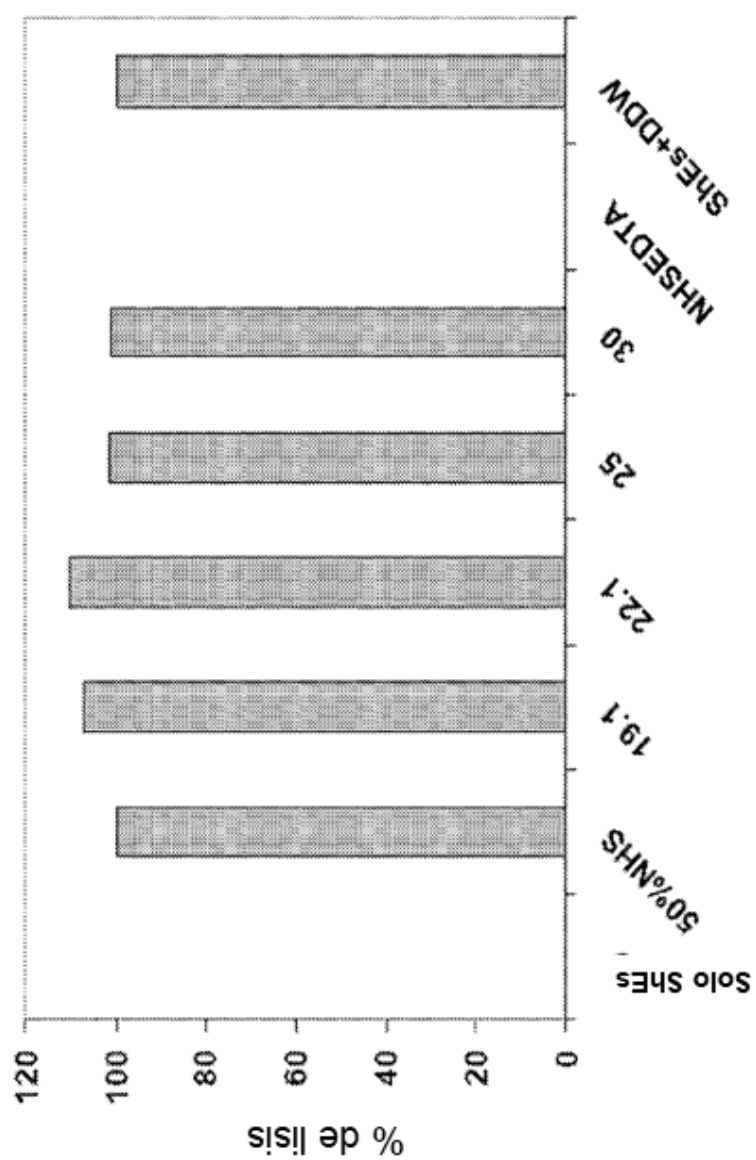


Figura 4

Secuencia de aminoácidos de properdina humana

MITEGAQAPRLLLPPLLLLTLPATGSDPVLCTQYEESGKCK
GLLGGVSVEDCCCLNTAFAYQKRSGGLCQPCRSRWSLWST
 WAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVGNWGQCSGKVA PGTLEWQLQ
 ACEDQQCCPEMGGWSGWGPWEPCSVTCSKGTRTRRACN
 HPAPKCGGHCPCGQAQSEACDTQQVCPTHGAWATWGPWT
 PCSASCHGGPHEPKETRSRKCSAPEPSQKPPGKPCPGLAYEQ
 RRCTGLPPCPVAGGWGPWGPVSPCPVTCGLGQTMQRTCN
 HPVPQHGGPFCAGDATRTHICNTAVPCPVDGEWDSWGEWS
 PCIRRNMKISCCQEI PGQQSRGRTCRGRKFDGHRCA GQQQD
 IRHCYSIQHCPLKGSWSEWSTWGLCMPPCGPNPTRARQLC
 TPLLPKYPPTVSMVEGQGEKNVTFWGRPLPRCEEELQGQKLV
 VEEKRPCLHVPACKDP EEEEL (SEQ ID No: 54)

Figura 5A

Dominios TSR de properdina humana

TSR-0	DFVLCFTQYEESSGKCKGLGGGVSVEDCCLN TAFAYQ KRSGLCQPCR (SEQ ID NO: 55)
TSR-1	SPRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQLR YRRCVGN GQCSGX VAPGTL EWQLQACEDQCCP (SEQ ID NO: 56)
TSR-2	EMGGWSGWGPWEPCSVTCSKGTRRRACNHPAPKCGG HCPGQAQEESEACDTQQVCP (SEQ ID NO: 57)
TSR-3	THGAWATWGPWTPCSASCHGGPH EPKETRSRKC S APEP SQKPPGKPCPGLA YEQRRC TGLPPCP (SEQ ID NO: 58)
TSR-4	VAGGWGPWGPVSPCPVTCCGLGQTM EQRTC NHPVPQHGG PFCAGDATRTHICNTAVPCP (SEQ ID NO: 59)
TSR-5	VDGEWDSWGEWSPCI RRNMKSI SCQEIPGQQSRGR TCR GRKF DGHRCAGQQQDI RH CYSIQHCP (SEQ ID NO: 60)
TSR-6	LKGSWSEWSTWGLCMPPCGPNPTRARQRLCTPLPKYP PTVSMV EGQGEKNVTFWGRPLPRCEE LQ GQKLVVEEK RPC LHVPA CKDP EEEEL (SEQ ID NO: 61)

Figura 5B

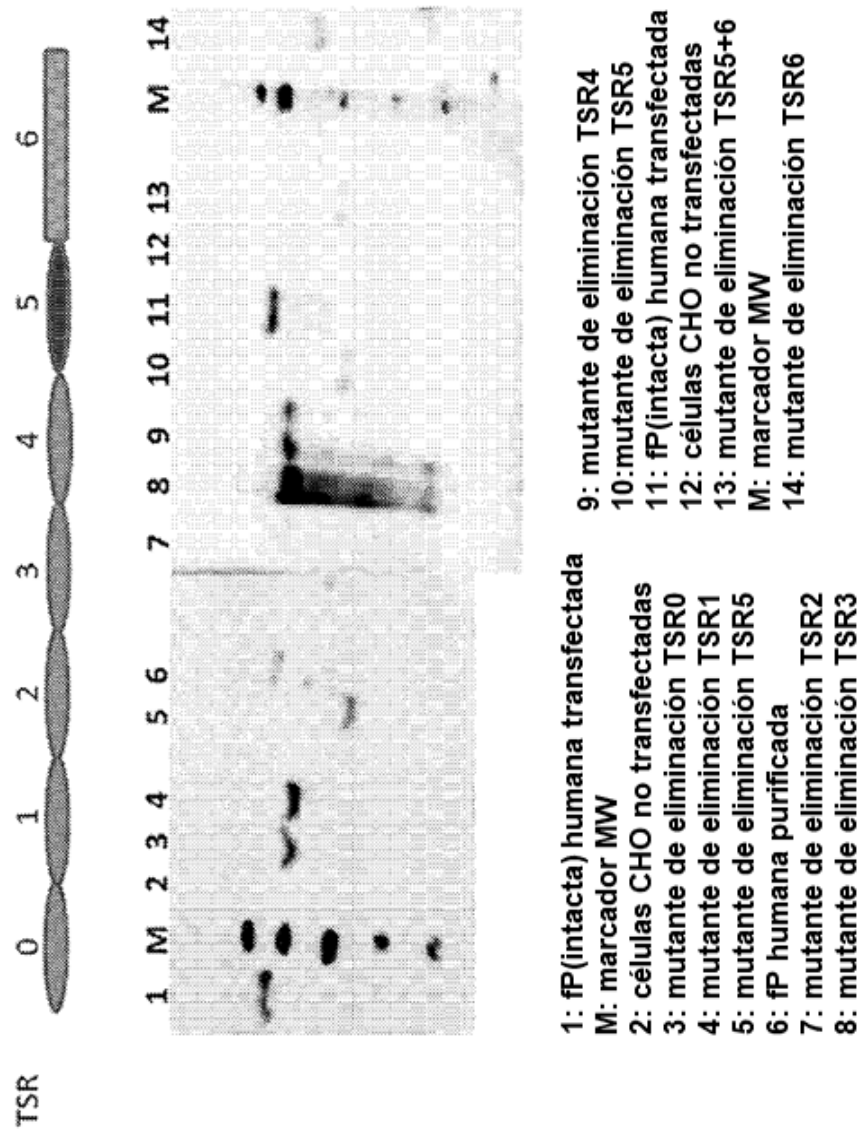


Figura 5C

Mapecto de epítomos de mutantes de eliminación mAb 19.1 y 25

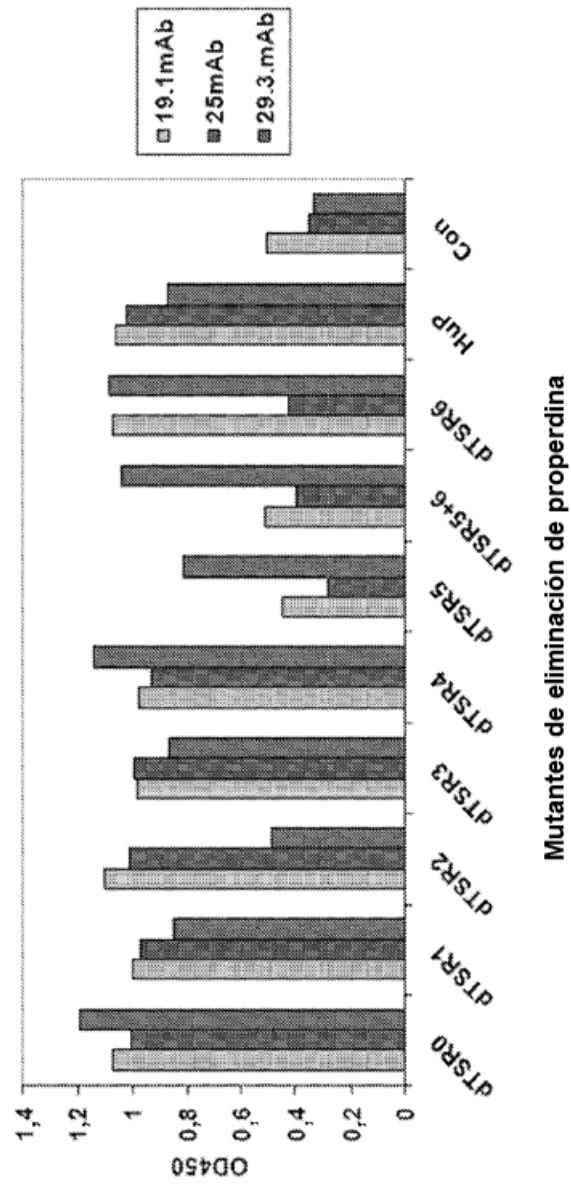


Figura 6

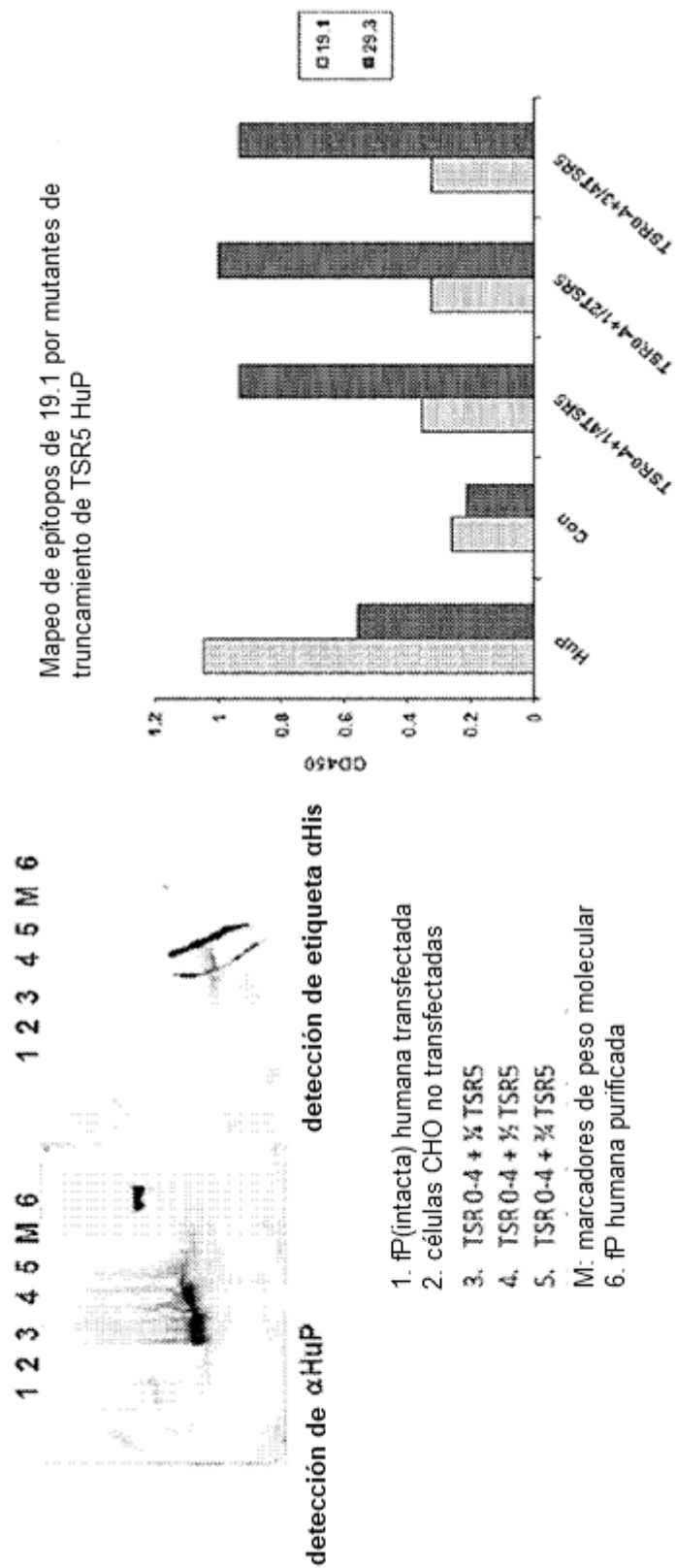


Figura 7

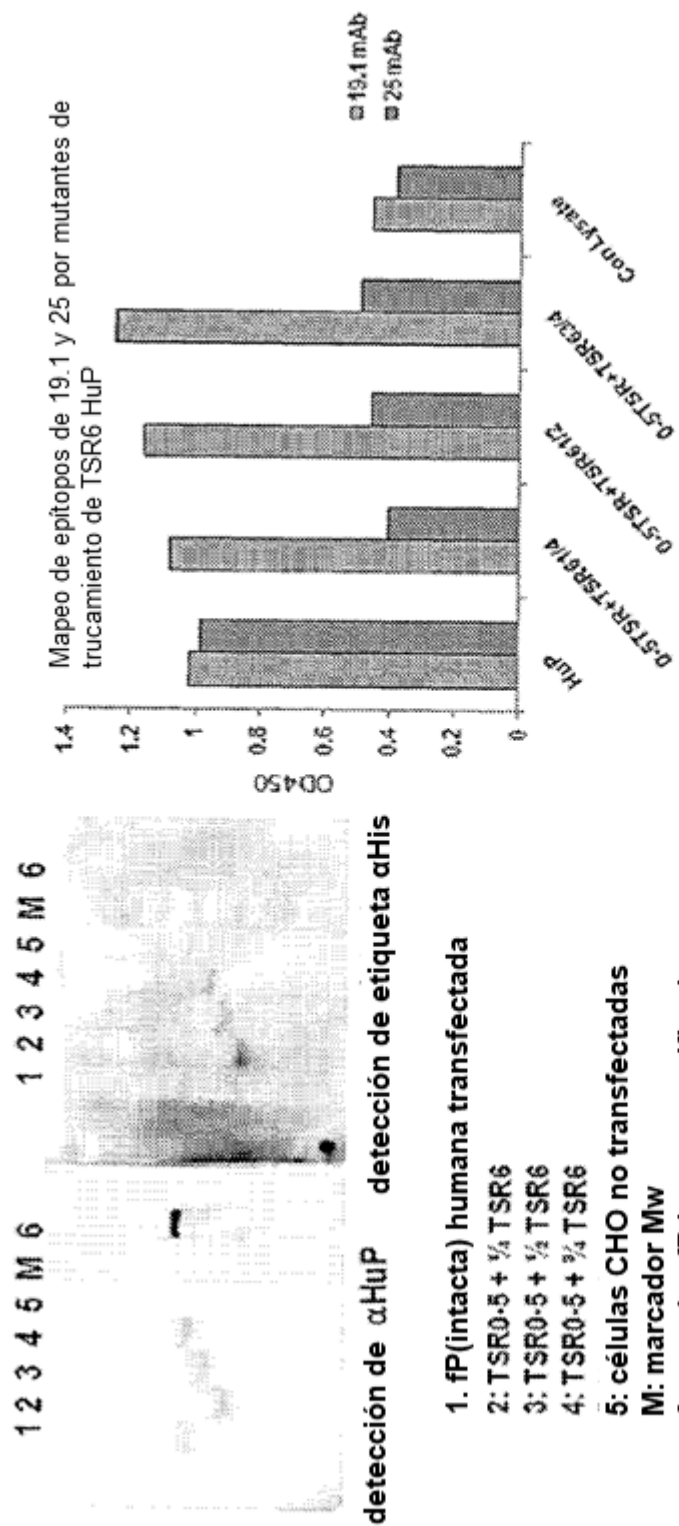


Figura 8A

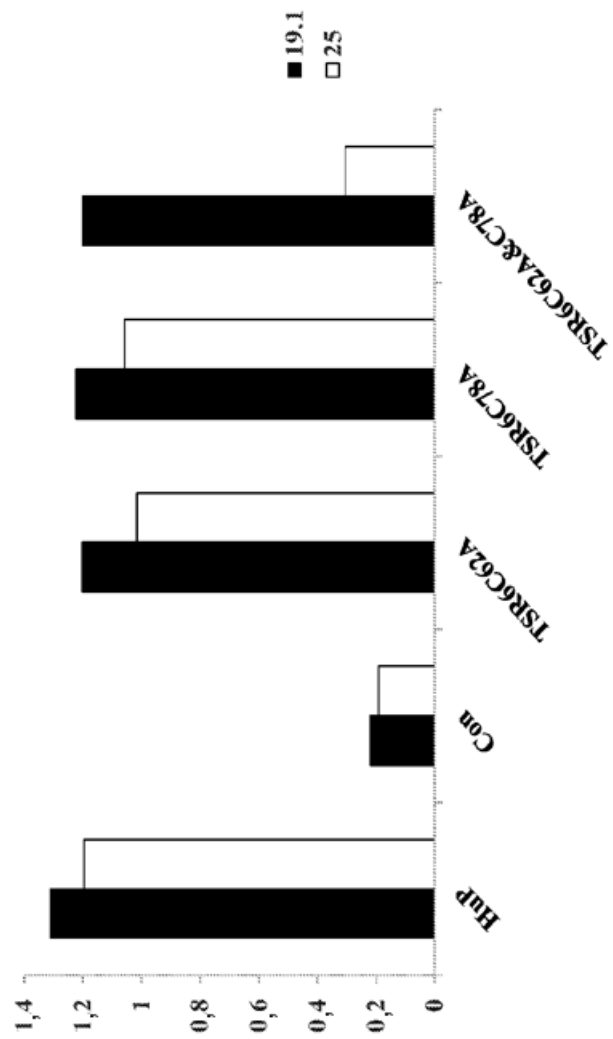


Figura 8B

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VH de mAb 19.1. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

SEQ. ID NO: 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	4
---------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VL de mAb 19.1. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

[illegible]

Figura 9

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VH de mAb 25. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

[illegible]

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VL de mAb 25. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

	(SEQ ID NO: 18)
	(SEQ ID NO: 19)
	(SEQ ID NO: 20)

Figura 10

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VH de mAb 22.1. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

(SEQ ID NO: 22)
 (SEQ ID NO: 23)
 (SEQ ID NO: 24)
 (SEQ ID NO: 25)

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VL de mAb 22.1. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

[illegible]

Figura 11

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VH de mAb 30. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

M	E	L	I	N	V	E	L	F	L	L	S	V	I	A	G	V	H	S
V	Q	L	Q	S	G	V	L	V	R	S	G	S	V	K	M	S		
C	K	I	S	G	X	T	A	Y	G	I	N	V	K	Q	R	F		
C	Q	G	L	E	N	I	G	I	Y	I	G	N	G	Y	T	D	Y	N
R	K	F	K	G	K	I	L	I	S	D	I	S	S	T	A	Y	M	
C	L	S	L	A	S	E	D	S	A	I	Y	E	C	A	R	S	G	W
D	R	D	Y	A	M	D	F	W	G	Q	I	S	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO: 32)

CDR1 (SEQ ID NO: 33)

CDR2 (SEQ ID NO: 34)

CDR3 (SEQ ID NO: 35)

Secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de VL de mAb 30. El péptido señal está subrayado y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita y resaltadas en gris.

M	S	V	R	I	Q	V	L	G	L	L	L	N	I	G	R	C		
D	I	Q	N	I	Q	S	P	A	S	L	S	A	S	V	G	L	V	I
I	C	R	A	S	E	N	I	Y	S	Y	L	A	N	I	Q	K	Q	
R	K	S	R	L	L	V	Y	H	A	K	T	L	A	R	C	V	I	S
R	F	S	G	S	G	T	Q	F	S	L	K	I	N	S	L	Q	P	
E	D	F	G	I	Y	C	Q	H	Y	G	P	P	T	E	G	S		
C	T	N	L	E	I	N												(SEQ ID NO: 36)

CDR1 (SEQ ID NO: 38)

CDR2 (SEQ ID NO: 39)

CDR3 (SEQ ID NO: 40)

Figura 12

Secuencia de VH humana: 1-69-06

[illegible]

VH-1-69-06 de 25 humanizada

MDWTWVFLFLSVTAGVHS
O B H K
S H S N
N B H D
O O S N
S B B B
V B B B
N H H H
V O H O
S O H V
S O V N
O B B V
B B B B
N O B B
N B B D
V V B B
B B B B
B B B B
O H B B V
S B B B B
O H H B V
V B B B B
B B B B
O B B B B
V B B B O
O B B B O

(SEQ ID NO: 49)

Figura 15

Secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada constante de IgG4 humana con mutación S228P

ASTKGPSVFPIAPCSRSSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKFEVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 63)

Secuencia de aminoácidos de la región ligera constante kappa humana

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSITYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 64)

Figura 17A

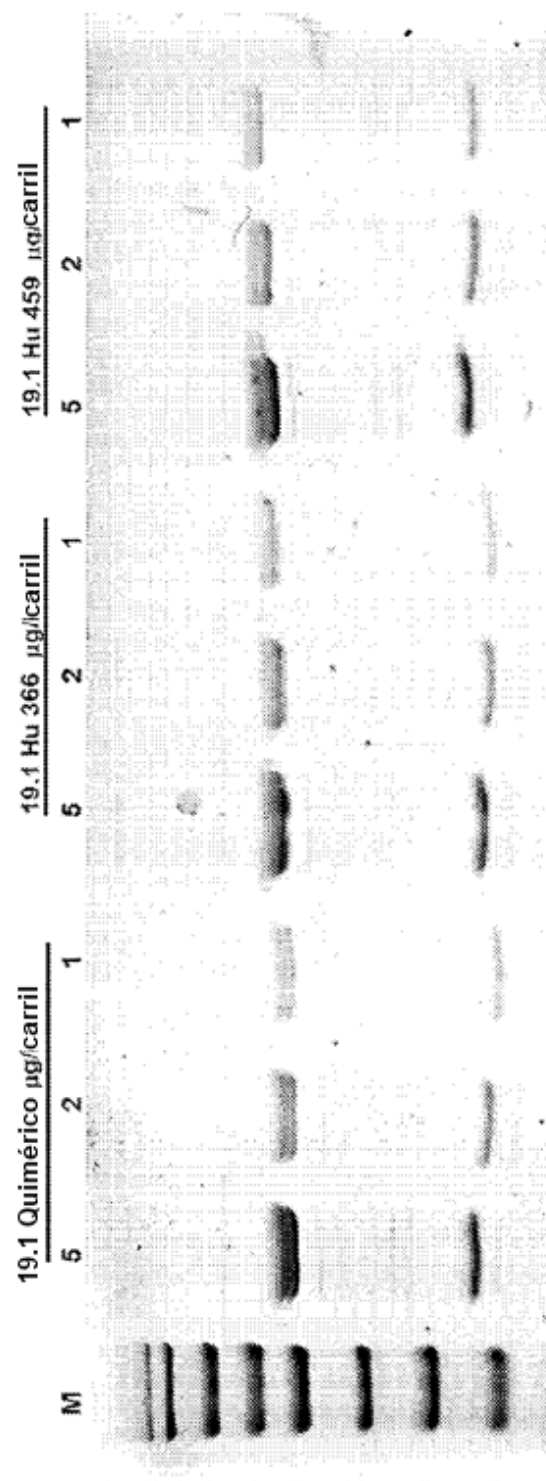


Figura 17A

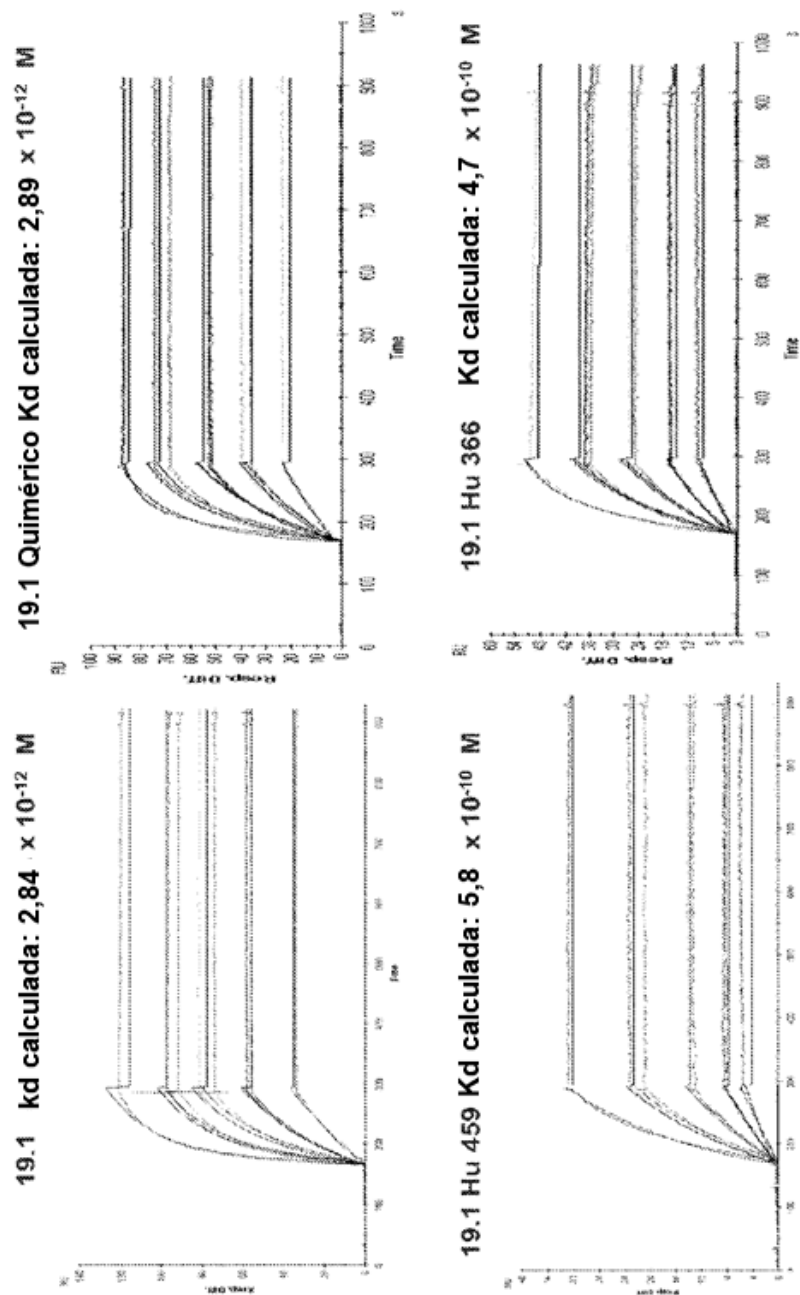


Figura 18

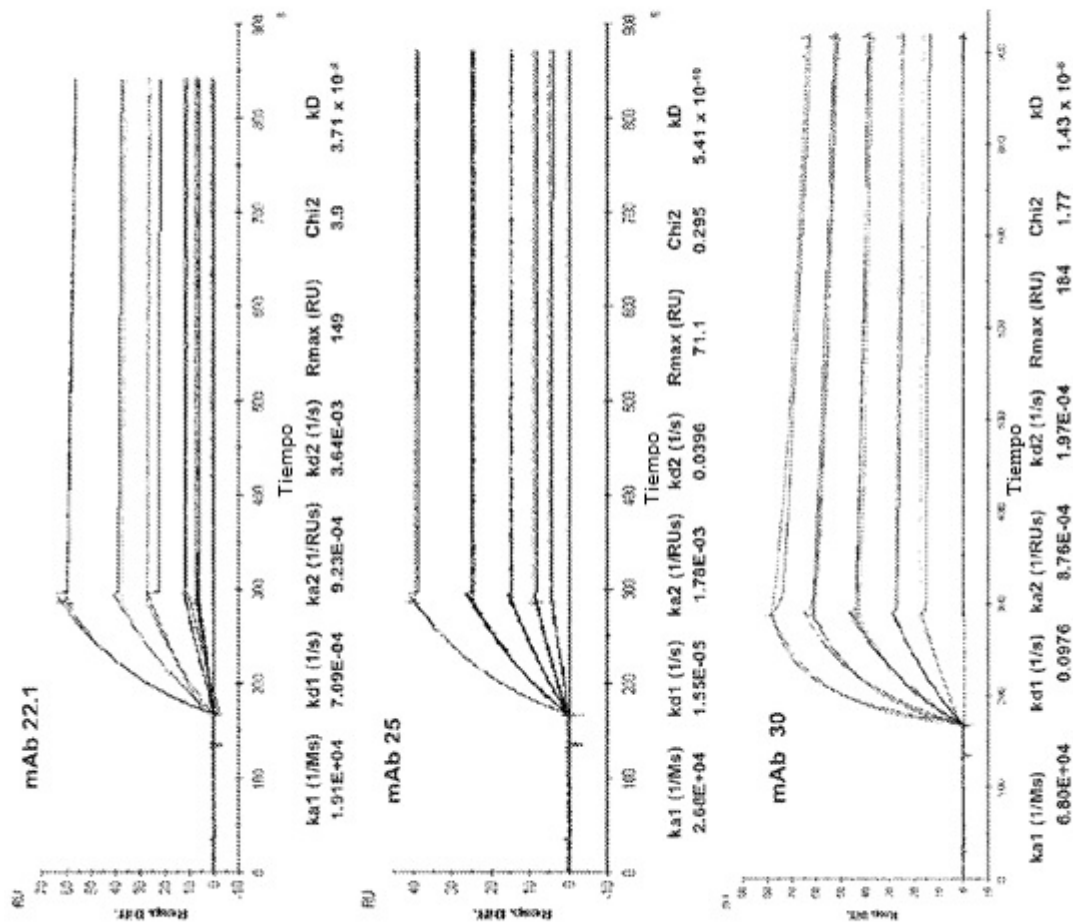


Figura 19

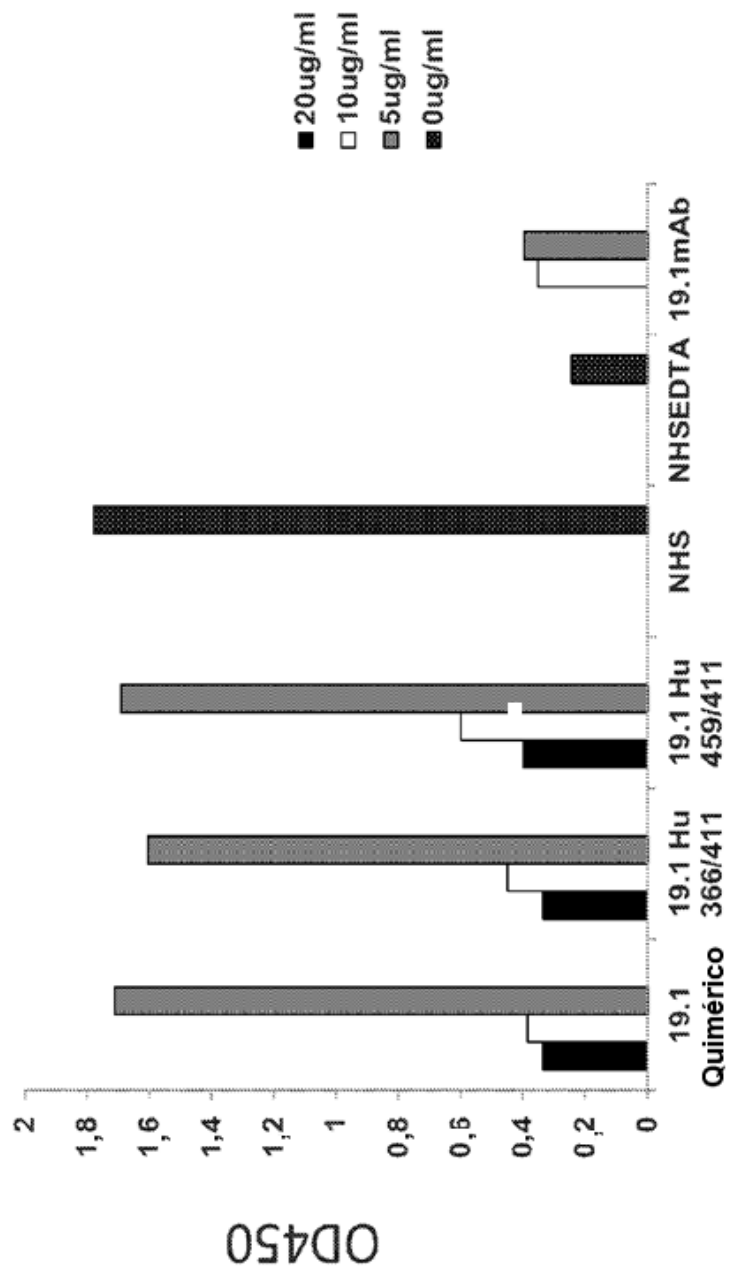


Figura 20

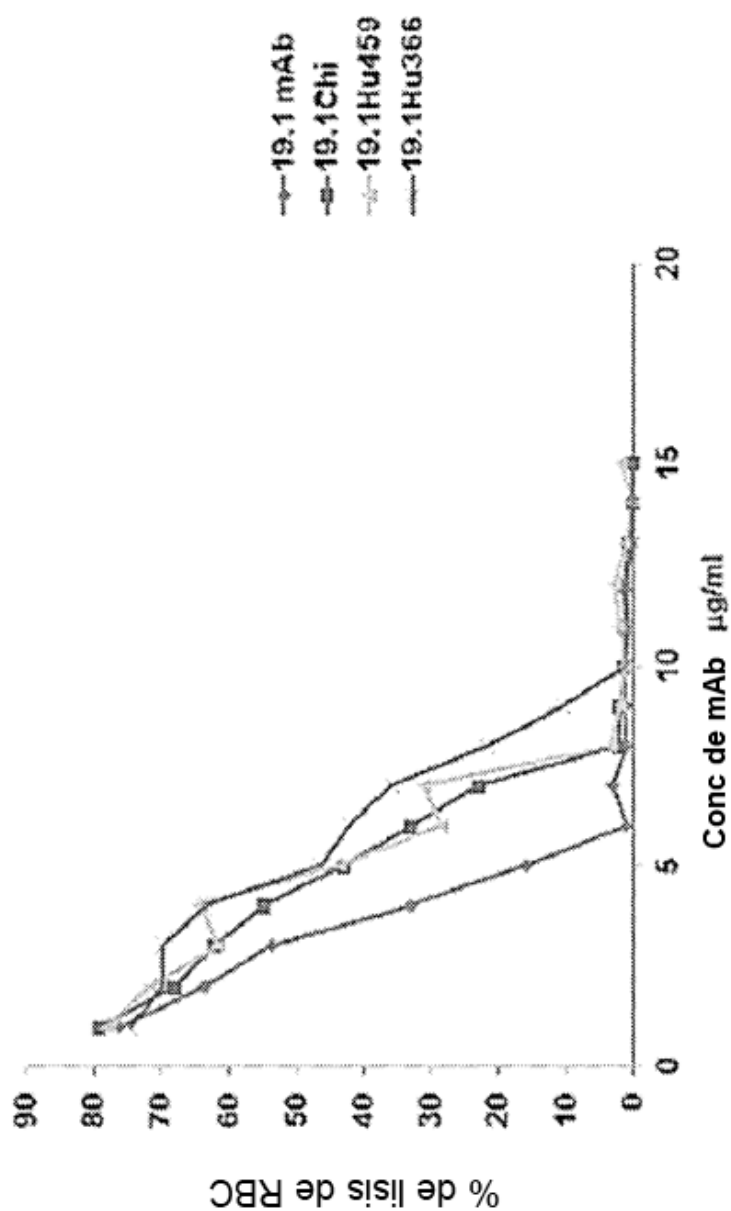


Figura 21

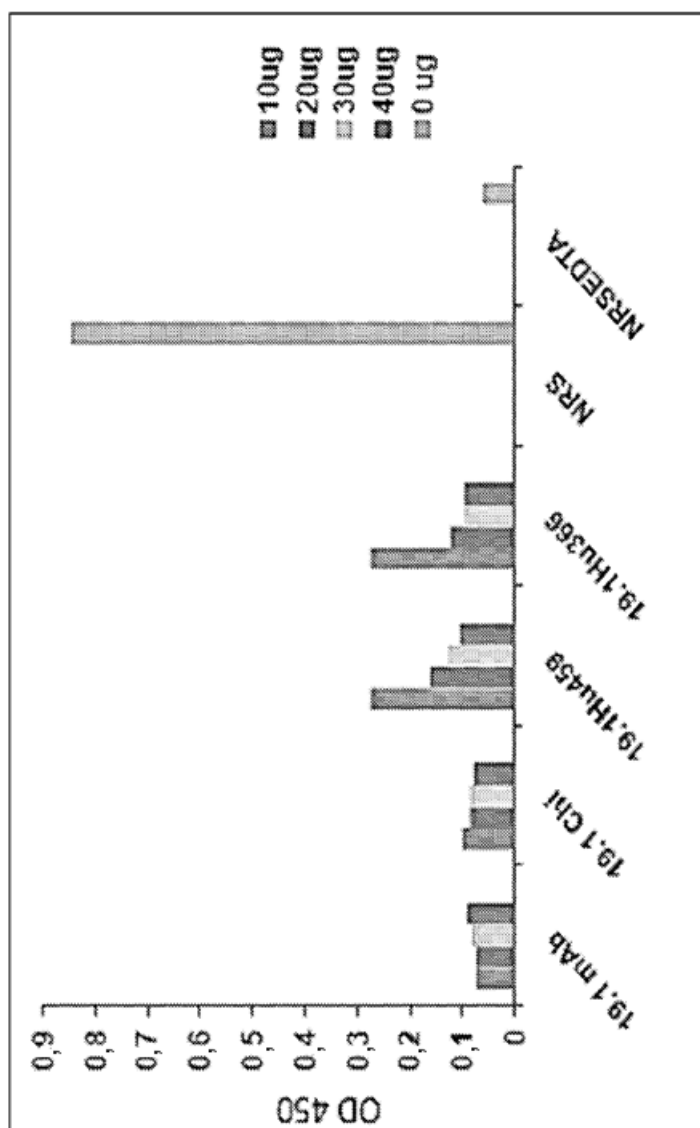


Figura 22

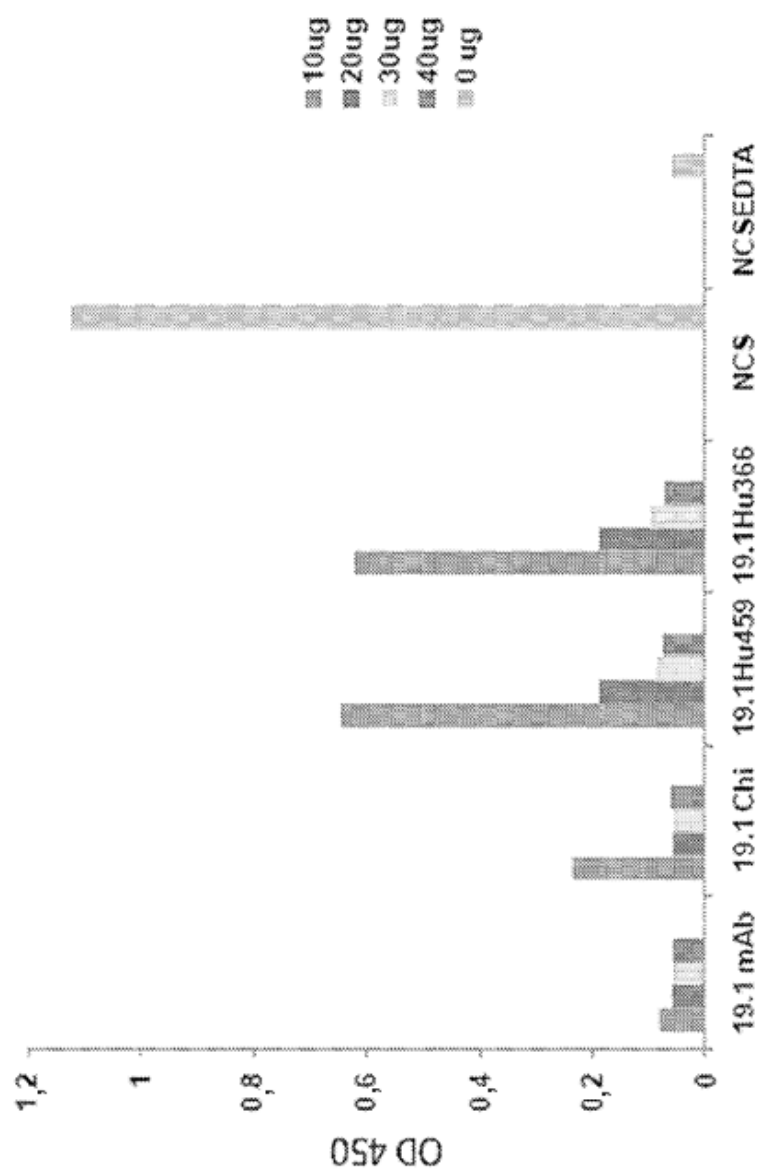


Figura 23

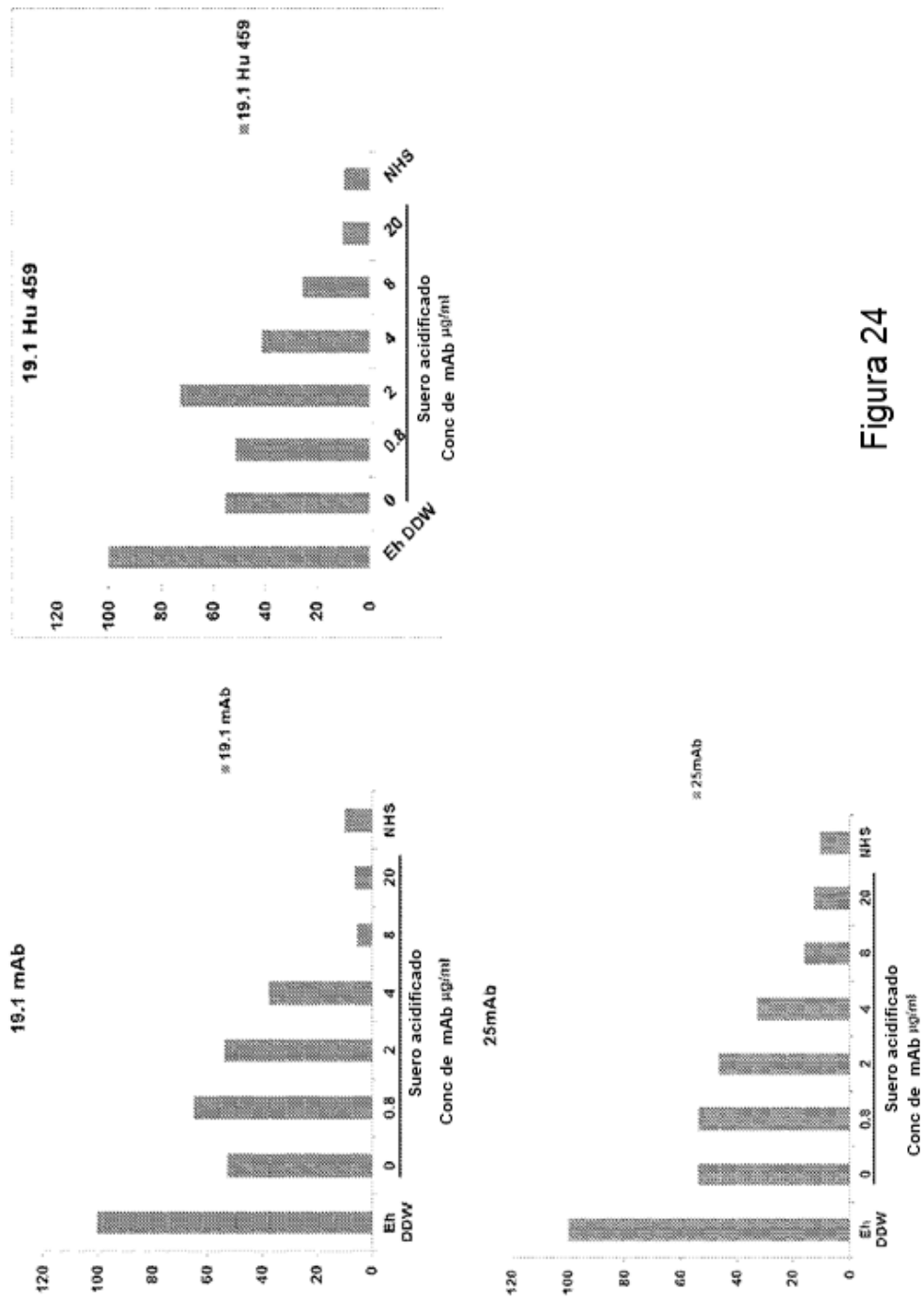


Figura 24

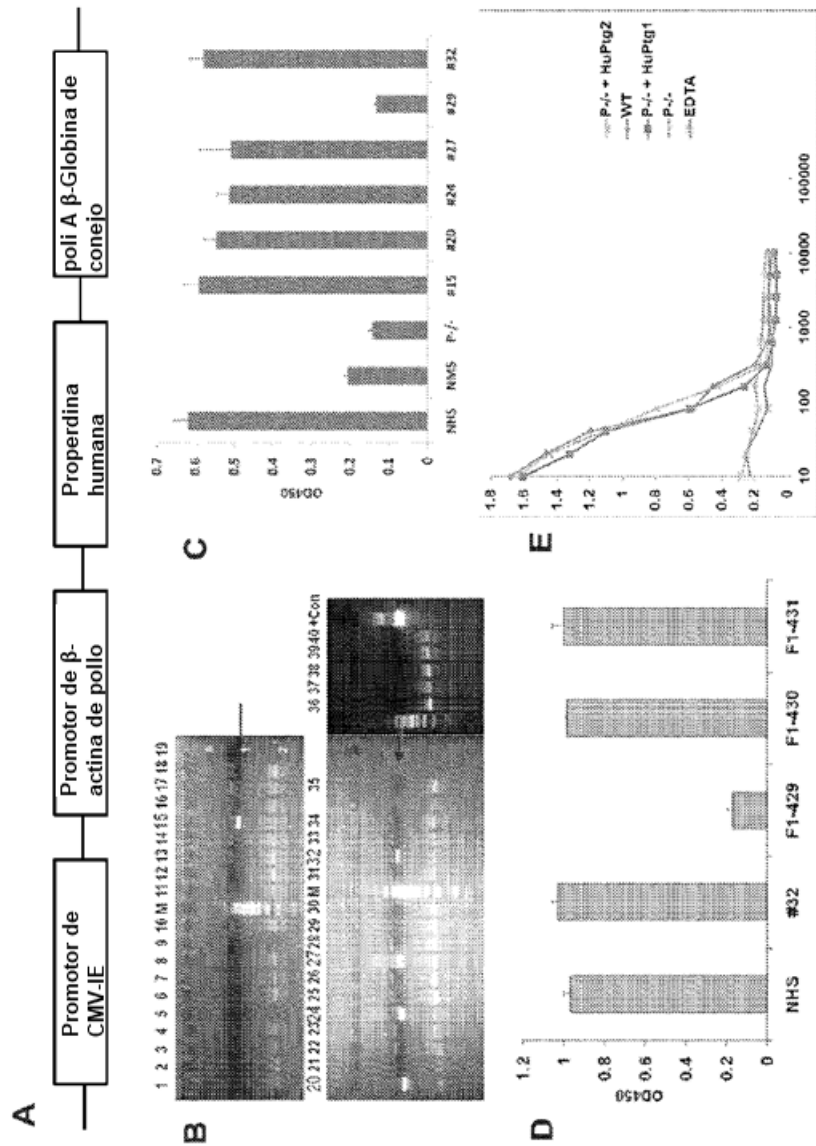


Figura 25

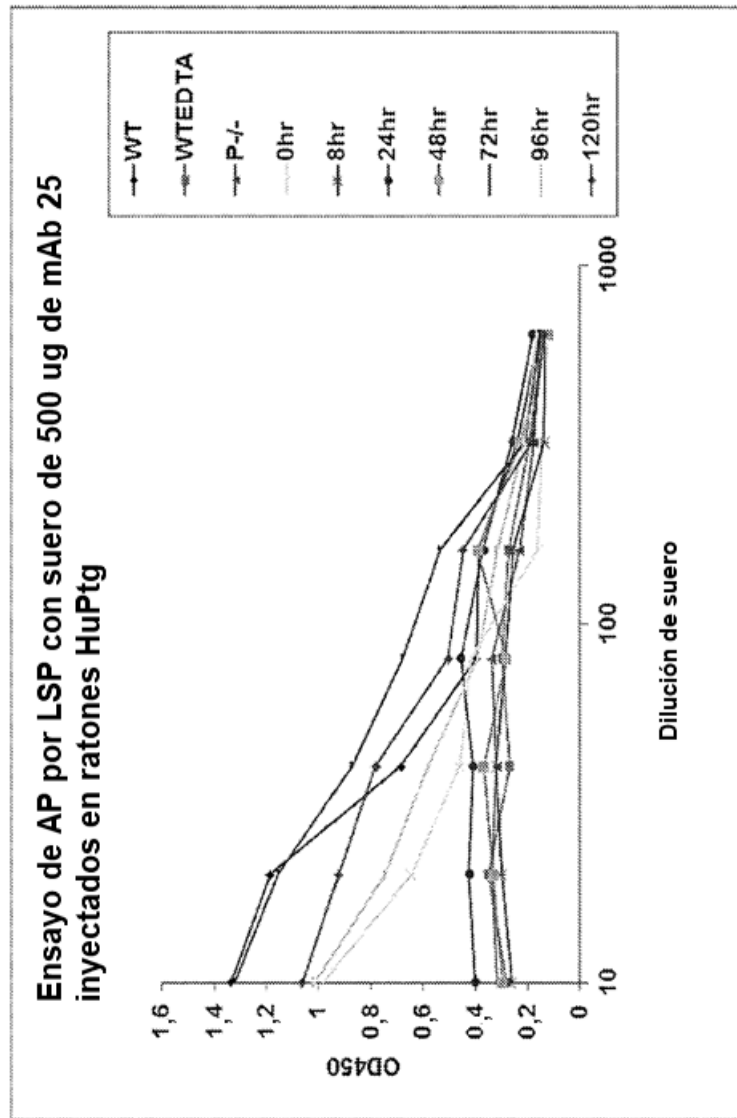


Figura 26

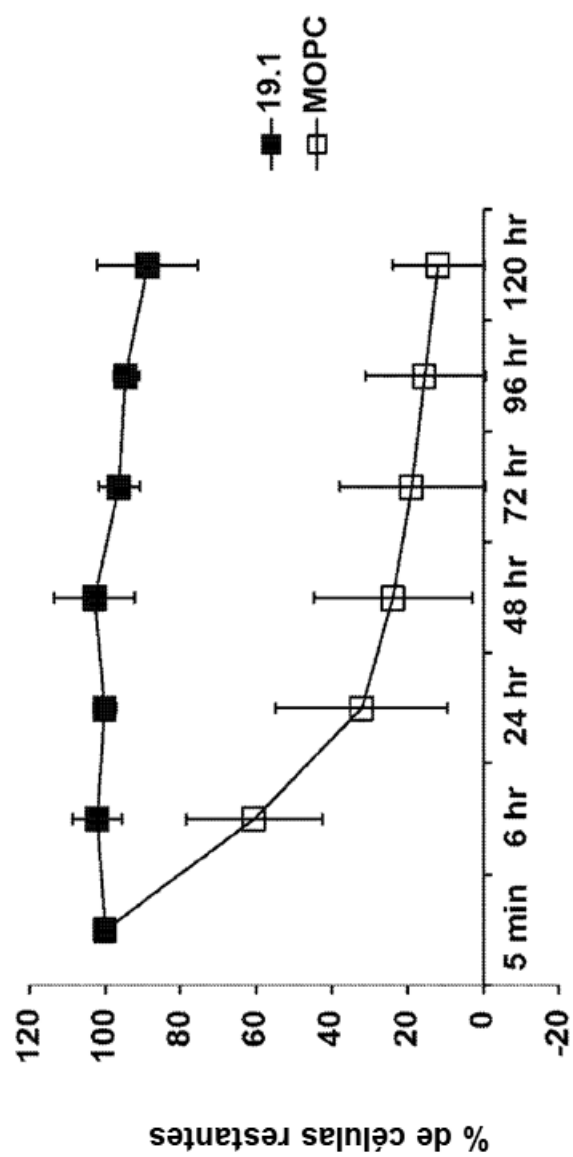


Figura 27

Secuencia de ADNc de properdina humana usada para producir ratones transgénicos

TATCAACCCAGATAAAGCGGACCTCTCTCTGGTAGAGGTGCAGGGGGCAGTACTCAATGATCACAGAGGGAGCG
CAGGCCCCCTCGATTGTTGCTGCCGGGCTGCTCTGCTGCTCAACCCTGCCAGCCACAGGCTCAGACCCCGTCTCTGC
TTCAACCCAGTATGAAGAATCTCTCGGCAAGTGAAGGGCTCTCTGGGGGTGGTGTCTCAGCGTGAAGACTGCTGTCTC
AACACTGCCCTTTGCCCTACCAGAAAGTAGTGGTGGGCTCTGTACGCTTGCAGGTTCCCAAGTGGTCCCTTTGGTCC
ACATGGGCCCCCTGTTCGGTGACGTGCTCTGAGGGCTCCAGCTGCGGTACCGGTGCTGTGGGCTGGAATGGGCAG
TGCTCTGGAAAGGTGGACCTGGGACCTGGAGTGGCAGTCCAGGCTGTGAGGACCCGACGCTGTCTCTGAGATG
GGGGCTGGTCTGGCTGGGCTGGGAGCTTGTCTGTACCTGCTCCAAGGGACCCGACCCGAGGGAGCC
TGTAATCACCTGCTCCCAAGTGGGGGCCACTGCCAGGACAGGACAGGAATCAGAGGCTGTGACACCCAGCAG
GTCTGCCCCACACACGGGGCTGGGCCACCTGGGGCCCTGGACCCCTGCTCAGCTCCTGCTGACGGTGGACCCAC
GAACCTAAGGAGACACGAAGCCGCAAGTGTCTGACCTGAGCCCTCCAGAAACCTCTGGGAAGCCCTGCCCGGG
CTAGCCTACGAGCAGCGGAGGTGCACCGGCTGCCACCTGCCAGTGGCTGGGGCTGGGGCTTGGGGCCCTGTG
AGCCCCCTGCTGTGACCTGTGGCTGGGCCAGACCATGGAAACACAGGACGTGCAATCACCCTGTGCCCCAGCATGGG
GGCCCCCTTCTGTGCTGGCGATGCCACCCGGACCCACATCTGCAACACAGTGTGCCCTGTGGATGGGAGTGG
GACTCGTGGGGGAGTGGAGCCCTGTATCCGACCGGAACATGAAGTCCATCAGCTGTCAAGAAATCCCGGGCCAGCAG
TCACGGGGAGGACCTGCAGGGCCGCAAGTTTGACGGACATCGATGTCCGGGCAACAGCAGGATATCCGGCAGTGC
TACAGCATCCAGCACTGCCCTTGAAGGATCATGGTCAAGTGGAGTACCTGGGGCTGTGCAATGCCCCCTGTGGGA
CCTAATCCTACCCGTGCCCGCAGGGCTCTGCACACCCCTGTCTCCCAAGTACCCGCCACCGTTTCCATGCTGAA
GGTCAGGGCGAGAAGAACGTGAACCTTCTGGGGGAGACCGCTGCCACGGTGTGAGGAGCTACAAGGGCAGAAGCTGGTG
GTGAGGAGAAACGACCATGTCTACACGTGCTTGTGCAAGACCCCTGAGGAAGAGGAACCTTAACACTTCTCTCT
CCACTCTGAGCCCCCTGACCTTCCAAACCTCAATAAATAGCCTCTTCGAAAAAATAAAAAA (SEQ ID NO: 67)

Figura 28