

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 609**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/NL2015/050584**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16028150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15787045 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3183266**

54 Título: **Anticuerpos que potencian el Factor H y sus usos**

30 Prioridad:

20.08.2014 EP 14181631

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2020

73 Titular/es:

**STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING
(100.0%)
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**KUIJPERS, TACO WILLEM;
WOUTERS, DIANA;
BROUWER, MARIA CLARA y
POUW, RICHARD BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 739 609 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 que potencian el Factor H y sus usos

5 La invención se refiere al campo de la inmunología y la medicina. En particular, la invención se refiere a anticuerpos específicos para el factor H y a sus usos.

10 El sistema del complemento es un elemento importante de la inmunidad innata que contribuye a la protección de muchos organismos, tales como los mamíferos, contra los patógenos invasores. El sistema del complemento consiste en más de 30 componentes diferentes que se sintetizan principalmente en el hígado. La activación del sistema del complemento tiene lugar por tres vías diferentes, la vía clásica, la vía de la lectina y la vía alternativa. Las tres vías convergen en la formación de una convertasa C3, las cuales son diferentes para cada vía, pero tienen una actividad similar.

15 En la ruta clásica del complemento, la activación del complejo componente (C) 1 del complemento, que consiste en C1q, C1r y C1s, tiene lugar al unirse a los complejos antígeno-anticuerpo. El complejo C1 escinde a C4 y C2, lo que conduce a la formación de una convertasa C3 que consiste en C4bC2a. La convertasa C3 escinde a C3 en los componentes activos C3a y C3b. En la vía de la lectina, la lectina de unión a manosa se une a los residuos de manosa en superficies patógenas que activan las serina proteasas MASP-1 y MASP-2 que son capaces de escindir a C4 y C2. Como en la ruta clásica, esto conduce a la formación de la convertasa C4bC2a C3. Esta convertasa C3 puede unirse a C3b para formar una convertasa C5. Al contrario de las vías clásicas y de la vía de la lectina, la vía alternativa tiene un bajo nivel de actividad continua debido a la hidrólisis espontánea de C3 a C3 (H₂O) en plasma. Este C3b-similar C3 (H₂O) puede formar una convertasa C3 en fase fluida mediante unión al factor B (FB), que a su vez se activa en Bb por el factor D. Del mismo modo, cuando C3b se une a una superficie, puede unirse a FB para formar C3bB. Este complejo se escinde por el factor D hacia C3bBb, que es la convertasa C3 de la vía alternativa, que puede estabilizarse con properdin (factor P) hacia C3bBbP. Esta convertasa C3 es capaz de escindir a C3 en C3a y C3b. Además de este proceso, la ruta alternativa actúa como un bucle de amplificación para las rutas de activación clásica y de lectina, ya que el C3b que se genera en estas rutas puede actuar como punto de partida para la ruta alternativa. De este modo, el bucle de amplificación da como resultado un refuerzo de la vía clásica y de la vía de la lectina. La convertasa C3 que se forma en una de las tres vías de activación puede unirse a C3b para formar una convertasa C5. Las convertasas C5 de las tres vías del complemento activan C5 hacia C5a y C5b, lo que inicia la vía terminal del sistema del complemento. C5b se une a C6, C7, C8 y C9 para formar el complejo de ataque a la membrana (MAC) que forma un canal transmembrana y provoca la lisis celular.

25 Después de formar un poro en la membrana de los patógenos, el complemento ayuda a eliminar los patógenos o las propias células alteradas mediante la opsonización con moléculas de C3b y la producción de péptidos proinflamatorios como C3a y C5a que atraen y activan las células inmunitarias hacia el sitio de la infección. Debido a la fuerte naturaleza proinflamatoria del complemento, las células huésped están bien protegidas por varias proteínas de membrana y proteínas solubles reguladoras del complemento.

35 La vía alternativa contribuye en un 80-90 % a la actividad total del complemento. Por lo tanto, la regulación de esta vía es crucial. Generalmente C3(H₂O) que se forman por hidrólisis espontánea de C3 y C3b, si no se unen a un patógeno, rápidamente se inactivan por el factor H (FH), el factor I (FI) y las moléculas de la superficie de la célula huésped, lo cual inhibe la formación de las convertasas C3. CD55 (también denominado factor de aceleración de la descomposición o DAF) se une a C3b en la superficie de la célula huésped. FI escinde a C3b hacia una forma inactiva, pero depende de los cofactores que se expresan en las superficies celulares (CD46, MCP) o circulantes en el plasma (FH). FH es una glucoproteína plasmática que es esencial para controlar la vía alternativa del complemento tanto en solución como en las superficies celulares. FH se une a C3b en la misma posición que FB, lo cual evita la formación de convertasas C3. FH también tiene una actividad aceleradora de la desintegración, es decir, promueve la disociación de las convertasas C3 de la ruta alternativa una vez que se han formado. La unión de FH a C3b está determinada por los carbohidratos presentes en la superficie celular. El ácido siálico, los glucosaminoglicanos y la heparina presentes en la superficie de la célula huésped promueven la unión de FH a C3b, mientras que la unión de C3b a las moléculas que se expresan en la superficie de los patógenos da como resultado la unión de FB. FH ejerce así su actividad inhibitoria del complemento sobre las células huésped, pero no en la superficie de las células patógenas porque las moléculas de la superficie celular que se unen a FH se expresan en las células huésped, pero generalmente no en las células patógenas.

40 La deficiencia de FH o el reconocimiento deficiente de las superficies del huésped debido a mutaciones se asocia al daño tisular mediado por complemento y a enfermedad. Después de controlar la activación del complemento durante la homeostasia normal, la FH también desempeña un papel importante en limitar el daño mediado por el complemento a células y tejidos enfermos. Se han descrito múltiples mutaciones en el gen *FH* que pudieran conducir a la pérdida de la función de la proteína FH. La región C-terminal de FH es un punto caliente para las mutaciones en la enfermedad. Esta es una región crítica para la unión de FH a las células huésped. La mayoría de las mutaciones asociadas a enfermedad en esta región interfieren con la unión de FH. La mayoría de los pacientes con un gen *FH* mutado tienen mutaciones heterocigotas, lo que significa que aproximadamente la mitad de la FH circulante tiene una función normal. Sin embargo, esto aparentemente no es suficiente para proteger las superficies propias en ciertas condiciones en las que se activa el complemento. La deficiencia de FH puede conducir a una enfermedad renal como la glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) y el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS). Más recientemente, se ha descrito una relación entre las mutaciones de FH y la enfermedad macular relacionada con la edad (AMD).

Actualmente, el tratamiento estándar para la deficiencia de FH, como en el aHUS, es la suplementación con plasma o la terapia de intercambio de plasma. Con dicha terapia se suplementan los reguladores deficientes del complemento. La terapia de intercambio de plasma además elimina los factores mutantes del complemento y/o los autoanticuerpos dirigidos contra los factores del complemento. Sin embargo, la terapia de plasma también tiene algunas limitaciones. Ningún estudio clínico prospectivo ha demostrado que la terapia de intercambio de plasma sea segura o efectiva para tratar el aHUS y la eficacia de la terapia de plasma puede depender de las mutaciones subyacentes. Algunos pacientes desarrollan reacciones anafilácticas al plasma fresco congelado, que pueden requerir el cese de cualquier forma de terapia con plasma. Además, el intercambio de plasma puede empeorar el cuadro clínico de aHUS debido a la administración de componentes patógenos activos del complemento derivados del plasma.

Recientemente, el anticuerpo monoclonal terapéutico eculizumab ha sido aprobado para el tratamiento del aHUS y la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) en varios países, entre los que se encuentran los Estados Unidos y países europeos. Eculizumab es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado específico para C5 que evita la escisión de C5 a C5a y C5b. Por lo tanto, evita la activación de la vía terminal y disminuye la afluencia de células inmunitarias. Sin embargo, el uso de eculizumab se asocia con efectos secundarios no deseados. Al bloquear C5, que es un componente crucial para el inicio de la vía terminal, los pacientes tratados con eculizumab se vuelven vulnerables a la infección con bacterias encapsuladas (tales como *Neisseria meningitidis*), cuya eliminación es muy dependiente de la formación de MAC. Por lo tanto, los pacientes deben estar vacunados contra el meningococo antes de recibir tratamiento con eculizumab. Además, como el eculizumab actúa aguas abajo de C3, se mantiene la deposición de C3, lo cual es perjudicial en varios trastornos que involucran una activación no deseada o excesiva del complemento. Además, el tratamiento con eculizumab tiene altos costos y la disponibilidad del anticuerpo es limitada.

Un anticuerpo monoclonal de ratón que se une a CCP18 se describe por Cheng y otros. (Clinical Chemistry, 2005). Se describe que este anticuerpo, llamado X52.1, aumenta la unión de FH a C3b y C3d, lo que se piensa que está provocado por la dimerización de FH. El aumento de la unión de FH a C3b y C3d inducido por X52.1 da como resultado un aumento de la lisis celular mediada por el complemento, con la inclusión de RBC y varios tipos de células cancerosas, como lo muestran Corey y otros. (J Biol Chem. 2000). Esto demuestra que el anticuerpo X52.1 inhibe la actividad inhibitoria del complemento de FH. De hecho, Corey y otros sugieren que el anticuerpo puede usarse en el tratamiento del cáncer al mejorar la lisis mediada por el complemento de las células cancerosas.

En vista de lo anterior, existe, por lo tanto, una necesidad de una terapia mejor para los trastornos asociados a una activación no deseada o excesiva del complemento.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una estrategia de tratamiento para trastornos asociados con una activación excesiva o no deseada de la ruta alternativa del sistema del complemento que venza las deficiencias de las estrategias de tratamiento actuales para tales trastornos. Un objeto adicional de la invención es proporcionar anticuerpos que puedan usarse en el tratamiento de tales trastornos que tengan propiedades mejores con respecto a los anticuerpos actualmente disponibles. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención son específicos para FH y potencian la función de FH, con la inhibición específica de la activación de la ruta alternativa del complemento.

La invención se expone en las reivindicaciones que se adjuntan. Las modalidades y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones que se adjuntan, no se consideran parte de la presente invención. La invención proporciona un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un fragmento del mismo que se une específicamente al dominio 17 de la proteína de control del complemento (CCP17) y/o CCP18 del factor H (FH) y potencia la actividad de FH.

Los presentes inventores por primera vez desarrollaron y aislaron un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a FH y que es capaz de potenciar la función de FH. Los anticuerpos potenciadores anti-FH de la invención son potentes inhibidores de la activación de la vía alternativa del complemento. Sin desear estar ligados a la teoría, se piensa que esta potenciación es independiente de la multimerización de las moléculas de FH por el anticuerpo. Como se demuestra en los Ejemplos, los anticuerpos potenciadores anti-FH inhiben o incluso bloquean completamente la lisis de los glóbulos rojos que se incuban con suero de donante humano sano. En condiciones normales, la incubación de glóbulos rojos de oveja (SRBC) con suero de un donante humano sano no conduce a la lisis de los SRBC, porque están protegidos por el factor H en el suero que se une al ácido siálico en la superficie del SRBC. Tras la incubación de suero humano normal con un anticuerpo monoclonal que bloquea la función de la FH, se observa la lisis de los SRBC. Esto puede explicarse por una protección insuficiente de la superficie celular por el FH del suero. Esta lisis inducida por un anticuerpo bloqueador anti-FH se inhibe o incluso se bloquea por los anticuerpos potenciadores de -FH de la presente invención. Los Ejemplos muestran, además, que los anticuerpos potenciadores anti-FH de la invención inhiben la deposición de C3 mediada por la vía alternativa sobre cimosán y lipopolisacárido (LPS). Se encontró, además, que el anticuerpo potenciador anti-FH restaura la función protectora de FH en el suero de 3 pacientes aHUS no relacionados. Como se demostró adicionalmente en los Ejemplos, la lisis de los glóbulos rojos incubados en presencia de suero de un paciente con aHUS se abolió completamente cuando el suero se preincubó con anticuerpos potenciadores anti-FH de la invención.

Los Ejemplos demuestran, además, que no solo los anticuerpos anti-FH intactos potencian la función de FH. El mismo efecto se observa para fragmentos Fab' y F(ab')₂ de tales anticuerpos. Como Fab' no puede formar uniones cruzadas con

las moléculas de FH, el efecto potenciador del anticuerpo y de los fragmentos de anticuerpo no puede ser el resultado de tales uniones cruzadas. Sin embargo, los Ejemplos demuestran que los anticuerpos anti-FH y sus fragmentos pueden inhibir la deposición de C3, lo que sugiere que los fragmentos probados pueden aumentar la unión de FH a C3b, iC3b y C3d. Por lo tanto, sin estar limitado por la teoría, se cree que la unión del anticuerpo potenciador anti-FH a FH provoca un cambio conformacional de la FH que produce un aumento de la unión de la FH a C3b, iC3b y C3d en la superficie de las células.

Los anticuerpos y fragmentos potenciadores anti-FH de acuerdo con la invención son altamente preferidos sobre los anticuerpos anti-C5, tales como el eculizumab, para inhibir la activación no deseada o excesiva de la vía alternativa del sistema del complemento. Las ventajas principales son que el efecto inhibitorio del complemento de los anticuerpos y fragmentos de la invención interfiere con la activación del complemento al nivel del C3 activado en lugar del C5 y que esta interferencia se produce al mejorar un inhibidor natural. Como resultado, solo se produce interferencia con C3 cuando C3 está activado. Por el contrario, con los inhibidores generales de C3, todos los C3 circulantes se bloquean, lo que puede conducir a una deficiencia general de C3. Aunque C3, como C5, que es el objetivo de eculizumab, está involucrado en las tres vías del sistema del complemento, FH inhibe específicamente el bucle de amplificación de la vía alternativa en donde la escisión de C3 en C3b y su subsiguiente unión a FB en la superficie celular y la formación de la convertasa C3 promueve la escisión de otras moléculas de C3 en C3b. La principal ventaja del hecho de que los anticuerpos y fragmentos de la invención interfieran con la activación del complemento a nivel de C3 es que se evita la acumulación de C3b en la superficie y la liberación de C3a. Por el contrario, si la activación del complemento se inhibe a nivel de C5, tal como con eculizumab, la acumulación de C3b y la liberación de C3a no se inhibe. C3b actúa como una opsonina y C3a es una anafilatoxina. Es preferible prevenir la acumulación de la formación de C3b y C3a, porque estos procesos resultan en la atracción de células inmunitarias y la opsonofagocitosis de la diana. Esto significa que, por ejemplo, los pacientes con PNH que reciben eculizumab aún necesitan transfusiones porque la acumulación de C3b da como resultado la opsonización de los glóbulos rojos, que posteriormente se eliminan en el hígado y en el bazo. Además, el tratamiento con anticuerpos anti-C5 da como resultado la acumulación de la formación de C3b y C3a en células que de otro modo se lisarían por el MAC. Una desventaja importante de los anticuerpos anti-C5 es que los pacientes se vuelven vulnerables a las infecciones porque los anticuerpos también interfieren con la activación del complemento inducida por patógenos. Al dirigirse a un regulador del sistema de complemento que protege las células huésped, esto se evita.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína de inmunoglobulina que comprende al menos una región variable de cadena pesada (VH), apareada con una región variable de cadena ligera (VL), que es específica para un epítipo diana. El término abarca tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Se refiere a cualquier forma de anticuerpo que se une específicamente a CCP17 y/o CCP18, preferentemente a CCP18, de FH, incluidas las inmunoglobulinas de longitud completa. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención comprende al menos un sitio de unión a antígeno. El término "sitio de unión a antígeno" como se usa en la presente descripción se refiere a un sitio de un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende al menos una secuencia CDR, preferentemente al menos dos secuencias CDR, con mayor preferencia al menos tres secuencias CDR. Por ejemplo, un sitio de unión a antígeno comprende varias CDR 1-3 de cadena ligera o varias CDR 1-3 de cadena pesada. Un sitio de unión a antígeno particularmente preferido comprende varias CDR 1-3 de cadena ligera y varias CDR 1-3 de cadena pesada. Un "fragmento de un anticuerpo" se define en la presente descripción como una parte que comparte al menos una propiedad con dicho anticuerpo en clase, no necesariamente en cantidad. Un fragmento es capaz de unirse específicamente al mismo antígeno que dicho anticuerpo, es decir, CCP17 y/o CCP18 de FH, aunque no necesariamente en la misma medida. Un fragmento de un anticuerpo comprende al menos una secuencia CDR de dicho anticuerpo. Dicho fragmento comprende preferentemente las secuencias de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo, así como las secuencias de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de dicho anticuerpo. Ejemplos no limitantes de un fragmento de un anticuerpo son un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un unicuerpo, un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento F(ab)₂. Un fragmento preferido de un anticuerpo comprende al menos un dominio variable de cadena pesada (VH) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL). Un fragmento más preferido comprende al menos un fragmento Fab. Como se demuestra en los ejemplos, los fragmentos Fab' de los anticuerpos potenciadores anti-FH de la invención conservan la capacidad de potenciar la función de FH. Los fragmentos particularmente preferidos son un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ y un fragmento F(ab)₂ de los anticuerpos de acuerdo con la invención.

Como bien sabe el experto en la técnica, los anticuerpos contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Una cadena pesada de un anticuerpo es el mayor de los dos tipos de cadenas que forman una molécula de inmunoglobulina. Una cadena pesada comprende un dominio constante y un dominio variable, cuyo dominio variable está involucrado en la unión del antígeno. Una cadena ligera de un anticuerpo es la más pequeña de los dos tipos de cadenas que forman una molécula de inmunoglobulina. Una cadena ligera comprende un dominio constante y un dominio variable. A menudo, pero no siempre, el dominio variable de la cadena ligera junto con el dominio variable de la cadena pesada está involucrado en la unión al antígeno. Las regiones de determinación complementaria (CDR) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de cadena pesada y en los dominios variables de cadena ligera. En el caso de anticuerpos de longitud completa, las CDR 1-3 de una cadena pesada y las CDR 1-3 de la cadena ligera conectada juntas forman el sitio de unión al antígeno.

El porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico, o el término "% de identidad de secuencia", se define en la presente descripción como el porcentaje de residuos de la longitud completa de una

secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que es idéntico a los residuos en una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad. Los métodos y programas informáticos para la alineación se conocen bien en la técnica, por ejemplo, "Align 2".

5 Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la invención se unen específicamente a CCP17 y/o CCP18 de FH. Los anticuerpos y fragmentos preferidos se unen al menos a CCP18 de FH. FH es una glucoproteína soluble de 155 kilodalton (kDa) que circula en el plasma. FH contiene 20 dominios de proteína de control del complemento (CCP), numerados del 1 al 20 que comienzan en el extremo N de FH. Los dominios CCP también se conocen como repeticiones de consenso corto (SCR) o dominios sushi. Los CCP 1-4 son dominios involucrados en la regulación y los CCP 19-20 están involucrados en unir C3b y CCP 6, 7, 8, 19 y 20 a los GAG y al ácido siálico que se expresan en la superficie de las células. Los anticuerpos que se unen a CCP19 y/o CCP20 inhiben la actividad de FH. Sin estar limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos que se unen a dominios ubicados adyacentes a los dominios de unión CCP19 y CCP20, es decir, CCP17 y CCP18, potencian la actividad de FH. De hecho, como se demuestra en los Ejemplos, un anticuerpo que se une a CCP18 potencia la función de FH. Como se usa en la presente descripción, los términos "específico para" y "se une específicamente" o "capaz de unirse específicamente" se refieren a la interacción no covalente entre un anticuerpo y su epítipo. Eso indica que el anticuerpo o fragmento se une preferentemente a dicho epítipo sobre otros epítopos u otros antígenos. Por lo tanto, aunque el anticuerpo o fragmento puede unirse no específicamente a otros epítopos o antígenos, la afinidad de unión de dicho anticuerpo o fragmento por su epítipo es significativamente mayor que la afinidad de unión de dicho anticuerpo o fragmento por cualquier otro epítipo o antígeno.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la invención son capaces de potenciar la actividad de FH, preferentemente de FH humana. Con el término "potenciar la actividad de FH" se entiende que la actividad de FH aumenta si un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención se une a FH. Aunque se conocen los anticuerpos que se unen específicamente a FH, estos anticuerpos se usan predominantemente para la detección de FH, por ejemplo, en inmunoensayos. Además, se han descrito anticuerpos específicos para la FH que bloquean o inhiben su función. Los presentes inventores por primera vez desarrollaron un anticuerpo específico de FH que, al unirse a FH, potencia su función. Sorprendentemente se encontró que la actividad de potenciar los anticuerpos anti-FH de la invención aumenta la actividad inhibidora del complemento de FH. Dicha actividad de FH puede potenciarse *in vitro* o *in vivo*. La actividad de FH que potencian los anticuerpos y fragmentos de la invención es preferentemente la inhibición de la activación alternativa del complemento, preferentemente en un individuo. Como se usa en la presente descripción, el término "activación alternativa del complemento" se refiere a la activación del sistema del complemento a través de la vía alternativa, es decir, que involucra al menos la formación de la convertasa C3 de la vía alternativa, es decir, C3bBb/C3bBbP, o que implica un aumento en la formación de esta convertasa C3. La activación alternativa del complemento puede, además, implicar la escisión de C3 en C3a y C3b por la vía alternativa convertasa C3, la formación de la vía alternativa convertasa C5, es decir, C3bBbC3b/C3bBbC3b, y/o la escisión de C5 y unión subsiguiente de C6, C7, C8 y C9 para formar el MAC. La activación alternativa del complemento puede incluir, además, un aumento en el bucle de amplificación de la vía alternativa. Dicha activación alternativa del complemento se inhibe preferentemente en un individuo, preferentemente en un fluido corporal de un individuo, preferentemente en sangre, líquido intersticial o líquido cefalorraquídeo, con mayor preferencia en sangre. Como se usa en la presente descripción, un "individuo" es un ser humano o un animal que comprende un sistema de complemento como parte de su sistema inmunológico. Preferiblemente dicho individuo es un mamífero, con mayor preferencia un ser humano.

Como se usa en la presente descripción, la "inhibición de la activación alternativa del complemento" comprende cualquier alteración en la cantidad o actividad de un componente, factor o actividad del sistema alternativo del complemento que causa o es el resultado de la inhibición de este. La inhibición de la activación alternativa del complemento, por ejemplo, comprende una inhibición de la actividad hemolítica, una inhibición de la deposición del componente 3 del complemento (C3) en las células de dicho individuo, un aumento de la unión de FH a C3b, iC3b y/o C3d, una inhibición de la formación de la vía alternativa del complemento convertasa C3 C3bBb/C3bBbP, una inhibición de la unión del factor B a C3b y/o inhibición de la interacción entre C3b y factor B, una inhibición de la escisión de C3 en C3a y C3b por la vía alternativa convertasa C3, un aumento en la unión de FH a las células huésped, en particular al ácido siálico, glucosaminoglicanos y/o heparina que se expresan en las células huésped, una inhibición del bucle de amplificación de la vía alternativa del complemento, e inhibición de la formación de la vía alternativa del complemento convertasa C5 C3bBbC3bP/C3bBbC3bP, una inhibición de la escisión de C5 a C5a y C5b por la vía alternativa convertasa C5, un aumento en la aceleración de la decadencia de la actividad de FH, es decir, promoción de la disociación de la vía alternativa convertasa C3 una vez que se han formado, y/o un aumento en la actividad del cofactor FI, que resulta en la degradación de C3b. La inhibición de la activación alternativa del complemento por FH que está potenciada por los anticuerpos anti-FH y los fragmentos de la invención comprende preferentemente una inhibición de la actividad hemolítica, una inhibición de la deposición de C3 en las células de dicho individuo, y/o un aumento de la unión de FH a C3b, iC3b y/o C3d.

"Inhibición" como se usa en la presente descripción significa preferentemente que la actividad indicada se reduce al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %, con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 %. Por lo tanto, la "inhibición de la activación alternativa del complemento" significa preferentemente que la actividad de la vía del complemento alternativo se reduce preferentemente al menos aproximadamente 25 %, con

mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. De manera similar, "una inhibición de la actividad hemolítica" significa que la actividad hemolítica se reduce preferentemente al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

5 "Aumento" como se usa en la presente descripción significa que la actividad indicada aumenta preferentemente al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 75 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 85 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %, con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95 %. Por lo tanto, "un aumento de la unión de FH a C3b" significa preferentemente que la unión de
10 FH a C3b se incrementa al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. De manera similar, "un aumento en la unión de FH a las células huésped" significa preferentemente que la unión de FH a las células huésped aumenta al menos aproximadamente 25 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

15 Como se usa en la presente descripción, "actividad hemolítica" se refiere a la ruptura de glóbulos rojos y la posterior liberación del contenido de la célula en, por ejemplo, la circulación inducida por la activación del sistema del complemento, preferentemente como resultado de la formación de MAC en la superficie celular. La actividad hemolítica se mide, por ejemplo, como se describe en la presente descripción en los Ejemplos mediante el uso de un ensayo hemolítico como lo describe Sanchez-Corral y otros. (2004) y Wouters y otros. (2008), opcionalmente con algunas modificaciones. En este
20 ensayo, los glóbulos rojos tales como los glóbulos rojos de oveja (SRBC) se incuban con suero, por ejemplo, suero humano, por ejemplo, a 37 °C durante 1.25 horas mientras se agita. Los sueros con niveles bajos de FH o FH disfuncional conducen a la lisis de los SRBC. La lisis puede detenerse mediante la adición de tampón veronal que contiene EDTA 20 mM seguido de centrifugación en una centrífuga previamente enfriada (por ejemplo, 7 °C) durante 2.5 minutos. El porcentaje de lisis de glóbulos rojos se determina mediante la medición de la absorbancia de los sobrenadantes y se midió a 412 nm. El suero puede ser, por ejemplo, de individuos humanos sanos o de individuos humanos que padecen un
25 trastorno asociado con la activación no deseada o excesiva de una vía alternativa del complemento, tal como el aHUS. La capacidad de un anticuerpo o fragmento para inhibir la actividad hemolítica puede determinarse mediante la incubación de los glóbulos rojos con suero en presencia del anticuerpo o fragmento.

30 La inhibición de la deposición de C3 se mide, por ejemplo, mediante la utilización de un ensayo de deposición de C3 como se describe en la presente descripción en los Ejemplos. Este ensayo involucra el recubrimiento de placas de microtitulación con cimosán o LPS. Las placas se incuban posteriormente con suero, por ejemplo, de individuos sanos o de individuos que padecen un trastorno asociado con una activación alternativa del complemento no deseada o excesiva, como se indicó anteriormente, en presencia o ausencia de anticuerpos o fragmentos. La deposición de C3 en cimosán o
35 LPS puede detectarse con un anticuerpo anti-C3.

Un aumento de la unión de FH a C3b se mide, por ejemplo, mediante la utilización de un ELISA, como se describe en la presente descripción en los Ejemplos. Este ensayo involucra el recubrimiento de la placa de microtitulación de ELISA con C3b y la incubación de la placa con suero, por ejemplo, de individuos sanos o de individuos que padecen un trastorno
40 asociado con una activación alternativa del complemento no deseada o excesiva, como se indicó anteriormente. La FH unida puede detectarse con un anticuerpo anti-FH, como el anti-FH policlonal marcado con peroxidasa. La capacidad de un anticuerpo o fragmento para mejorar la unión de FH a C3b puede determinarse mediante preincubación del suero en presencia del anticuerpo o fragmento antes de la incubación con el C3b recubierto. Como otro ejemplo, la unión de FH a C3b puede determinarse mediante la utilización de la Resonancia de Superficie Plasmones (SPR). SPR es una técnica
45 para medir interacciones biomoleculares en tiempo real en un entorno sin marcaje. Uno de los interactuantes, por ejemplo C3b, está inmovilizado en la superficie de un sensor, y el otro, por ejemplo, FH, está libre en solución y se pasa sobre la superficie, por ejemplo, en presencia o ausencia de (diferentes concentraciones de) un anticuerpo o fragmento. de la invención.

50 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención son preferentemente anticuerpos o fragmentos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que consiste en una única especie molecular. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse ventajosamente de manera recombinante, de modo que pueden obtenerse cantidades del anticuerpo que son significativamente mayores que las de los anticuerpos policlonales presentes en un antisuero. Sin embargo, la invención también abarca anticuerpos policlonales y fragmentos. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con
55 la presente invención es preferentemente un anticuerpo quimérico o humanizado. Dicho anticuerpo o fragmento, por lo tanto, comprende preferentemente al menos regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada humanas. Con mayor preferencia, dicho anticuerpo o fragmento también comprende regiones marco humanas en las regiones variables de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos o fragmentos humanos, que consisten completamente en secuencias humanas se prefieren más. El uso de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos se prefiere con respecto al uso
60 de anticuerpos no humanos porque el uso de anticuerpos o fragmentos no humanos para el tratamiento de enfermedades humanas se ve obstaculizado por una serie de factores. El cuerpo humano puede reconocer anticuerpos no humanos como extraños, lo cual resultará en una respuesta inmunitaria contra los anticuerpos o fragmentos no humanos, lo que resulta en efectos secundarios adversos y/o la eliminación rápida de los anticuerpos o fragmentos de la circulación. La posibilidad de efectos secundarios se reduce cuando se administran anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos a los seres humanos. Además, generalmente se logra una vida media más larga en la circulación cuando se usan
65

anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos debido a un aclaramiento reducido cuando se comparan con anticuerpos no humanos.

5 Los anticuerpos específicos para un antígeno particular, tal como FH de acuerdo con la presente invención, pueden prepararse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, FH humana puede usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos. Como otro ejemplo, el dominio CCP17 y/o CCP18 de FH humana puede usarse como un inmunógeno. Un ejemplo de tal método es mediante la inmunización y la generación de hibridomas como se describe en los Ejemplos. Los anticuerpos monoclonales de ratón contra FH pueden generarse, por ejemplo, mediante la inmunización de ratones, por ejemplo, ratones BALB/c, intraperitonealmente con factor H humano, opcionalmente en presencia de un adyuvante, como montanida, por ejemplo, a intervalos de cuatro semanas. Varios días después de la cuarta inmunización, las células del bazo pueden fusionarse, por ejemplo, con la línea celular de mieloma SP2/0. La presencia de anticuerpos específicos para el factor H en los sobrenadantes de los hibridomas puede probarse mediante ELISA. Por ejemplo, las placas de microtitulación están recubiertas con un AcM (por ejemplo, el AcM kappa RM19 anti-ratón generado en rata) para capturar los anticuerpos IgG de ratón. La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante el factor H biotinilado. Otro ejemplo de un método para proporcionar anticuerpos específicos de FH es mediante la selección de bibliotecas de presentación de fagos que expresan secuencias de ácidos nucleicos recombinantes que codifican cadenas de inmunoglobulina. Los métodos para la presentación de fagos de anticuerpos se han usado en la técnica y se han descrito ampliamente. La selección de la biblioteca de anticuerpos puede realizarse con el mismo antígeno que se usa para la inmunización, por ejemplo, FH humana o el dominio CCP17 y/o CCP18 de FH humana.

20 Una vez que se han obtenido los anticuerpos o fragmentos específicos para FH, en particular para CCP17 y/o CCP18 de FH, la actividad biológica deseada de los mismos, es decir, su capacidad para potenciar la actividad de FH, puede probarse mediante varios métodos conocidos por los expertos. Como se describió anteriormente en la presente descripción, potenciar la actividad de FH incluye preferentemente la inhibición de la actividad hemolítica, la inhibición de la deposición de C3 en las células y/o un aumento de la unión de FH a C3b. Los ensayos funcionales para probar estas actividades se han descrito en la presente descripción anteriormente y se detallan en los Ejemplos.

30 Un anticuerpo que se prefiere particularmente según la invención es el anticuerpo anti-FH.07, cuya preparación e identificación se describe en los Ejemplos. La Tabla 1 proporciona una descripción general de las secuencias variables de cadena pesada y ligera, así como las secuencias individuales de CDR, del anticuerpo anti-FH.07. Se prefieren aún más los anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados o fragmentos de los mismos que comprenden las secuencias CDR de cadena pesada y las secuencias CDR de cadena ligera del anticuerpo anti-FH.07 o la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-FH.07. Los términos "anti-FH.07" como se usan en la presente descripción abarcan todos los anticuerpos y fragmentos que tienen al menos la región CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera como se muestra en la Tabla 1, tal como por ejemplo, anticuerpos aislados y/o purificados o anticuerpos producidos de manera recombinante. Otro anticuerpo o fragmento preferido de acuerdo con la invención es un anticuerpo o fragmento que compete con el anticuerpo anti-FH.07 para unirse a FH, en particular a CCP18 de FH. Por lo tanto, también se proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a CCP17 y/o CCP18, preferentemente a CCP18, del factor H (FH), que potencia la actividad de FH, y que compete con el anticuerpo anti-FH.07 por la unión a FH. La competencia puede determinarse mediante la utilización de un método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante resonancia de superficie de plasmones mediante la utilización de un instrumento Biacore T3000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), en el cual la FH se inmoviliza en un chip sensor y los anticuerpos potencialmente competidores se hacen volar sobre el FH inmovilizado. Es posible producir un anticuerpo o fragmento del mismo que comprenda al menos una secuencia CDR como se muestra en la Tabla 1, que es específica para CCP18 de FH, basada en las secuencias CDR de cadena pesada y cadena ligera de la Tabla 1.

Por lo tanto, la invención proporciona, además, un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o fragmento del mismo que comprende:

- 50 - una secuencia de cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO:5, y/o
 - una secuencia de cadena pesada CDR2 de SEQ ID NO:6, y/o
 - una secuencia de cadena pesada CDR3 de SEQ ID NO:7, y/o
 - una secuencia de cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO:1, y/o
 - una secuencia de cadena ligera CDR2 de SEQ ID NO:2, y/o
 55 - una secuencia de cadena ligera CDR3 de SEQ ID NO:3. Dicho anticuerpo preferentemente se une específicamente al complemento CCP17 y/o CCP18 de FH, con mayor preferencia a CCP18, y potencia la actividad de FH. Con mayor preferencia, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención comprende las tres CDR de cadena pesada y las tres CDR de cadena ligera de la Tabla 1. En una modalidad, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y/o una secuencia de región variable de cadena ligera como se muestra en la tabla 1. Por lo tanto, también se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención que tiene una secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO:8 y/o que tiene una secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO:4.

65 Opcionalmente, la secuencia de al menos una de dichas CDR se optimiza, y se genera así una variante de anticuerpo, por ejemplo, para mejorar la afinidad de unión, la capacidad de potenciación de FH o la estabilidad del almacenamiento *in vivo*. Además, opcionalmente, al menos una secuencia en al menos una de las regiones marco de un anticuerpo o

fragmento de la invención se optimiza, por ejemplo, para mejorar la eficacia de la unión o la estabilidad del anticuerpo o fragmento o para reducir los efectos secundarios de secuencias no humanas después de su administración a un humano. Esto se hace, por ejemplo, mediante procedimientos de mutagénesis. Un experto en la técnica es capaz de generar variantes de anticuerpos que comprenden al menos una CDR o secuencia marco alterada. Las secuencias CDR y/o marco se optimizan, por ejemplo, mediante la mutación de una molécula de ácido nucleico que codifica dicha secuencia marco. Por ejemplo, se aplica la sustitución conservadora de aminoácidos. Los ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, y la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Con el fin de seleccionar un anticuerpo o fragmento mejorado, preferentemente se ensayan la afinidad de unión, la capacidad potenciadora de FH y/o la estabilidad de las variantes de anticuerpos resultantes. Preferentemente, las secuencias de la línea germinal humana se usan para regiones marco en anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la invención. El uso de secuencias de la línea germinal humana minimiza el riesgo de inmunogenicidad de dichos anticuerpos, porque estas secuencias tienen menos probabilidades de contener alteraciones somáticas que son únicas para los individuos de los que se derivan las regiones marco, y pueden causar una respuesta inmunogénica cuando se aplican a otro individuo humano. Típicamente, hasta tres residuos de aminoácidos de una secuencia CDR pueden variar mientras se mantiene la misma especificidad. Por lo tanto, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención contiene preferentemente una secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera en donde a lo sumo 3, preferentemente a lo sumo 2, con mayor preferencia a lo sumo 1 aminoácido de cada CDR varía en comparación con las secuencias de las cadenas pesada y ligera CDR1, CDR2 y CDR3 de la Tabla 1.

Por lo tanto, la invención proporciona, además, un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o fragmento del mismo que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:5, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:6, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:7, y/o
- una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 1, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO:2, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 3. Dicho anticuerpo preferentemente se une específicamente al complemento CCP17 y/o CCP18 de FH, con mayor preferencia a CCP18, y potencia la actividad de FH. Preferentemente, dicho anticuerpo o fragmento comprende secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada y/o secuencias CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera que son al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 86 %, con mayor preferencia al menos 87 %, con mayor preferencia al menos 88 %, con mayor preferencia al menos 89 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 91 %, con mayor preferencia al menos 92 %, con mayor preferencia al menos 93 %, con mayor preferencia al menos 94 %, con mayor preferencia al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 96 %, con mayor preferencia al menos 97 %, con mayor preferencia al menos 98 %, con mayor preferencia al menos 99 %, idéntico a estas secuencias.

Además, se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención que comprende o tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEC ID N°: 8 y/o que comprende o tiene una secuencia de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEC ID N°: 4, o secuencias que son al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 86 %, con mayor preferencia al menos 87 %, con mayor preferencia al menos 88 %, con mayor preferencia al menos 89 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 91 %, con mayor preferencia al menos 92 %, con mayor preferencia al menos 93 %, con mayor preferencia al menos 94 %, con mayor preferencia al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 96 %, con mayor preferencia al menos 97 %, con mayor preferencia al menos 98 %, con mayor preferencia al menos 99 %, idéntico a cualquiera de estas secuencias de región variable de cadena pesada o cadena ligera.

La invención proporciona, además, una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención. Las moléculas de ácido nucleico que se prefieren codifican al menos la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 y la cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 1. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención tiene una longitud de al menos 30 nucleótidos, con mayor preferencia al menos 50 nucleótidos, con mayor preferencia al menos 75 nucleótidos. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica un anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado o un fragmento del mismo que comprende las secuencias CDR de cadena pesada y las secuencias CDR de cadena ligera del anticuerpo anti-FH.07 o la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-FH.07 como se muestra en la Tabla 1. Las secuencias de ácido nucleico que codifican CDR de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-FH.07 se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, la invención también abarca las moléculas de ácido nucleico que codifican una CDR de cadena pesada o ligera de un anticuerpo de acuerdo con la invención comprenden secuencias de ácido nucleico que difieren de las

5 secuencias de ácido nucleico de CDR que se muestran en la tabla 1 pero que comprenden codones de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de dicha CDR de cadena pesada o ligera que se muestra en la Tabla 1. Por lo tanto, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos las secuencias de SEC ID NO 1, 2, 3, 5, 6 y 7. Además, se proporciona una
 10 molécula aislada de ácido nucleico, sintética o recombinante, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos las secuencias de SEC ID NO 4 y 8. Las moléculas de ácido nucleico que codifican una CDR de cadena pesada y/o ligera o un anticuerpo que se modifica, por ejemplo, mediante una sustitución conservadora de aminoácidos, también están incluidas en la invención, siempre que la secuencia de aminoácidos de CDR codificada tenga al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de CDR representada en la tabla 1, preferentemente al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 %.

15 Una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende preferentemente una cadena de nucleótidos, con mayor preferencia ADN y/o ARN. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico de la invención puede comprender otros tipos de estructuras de ácido nucleico tales como, por ejemplo, una hélice de ADN/ARN, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) y/o una ribozima. Tales otras estructuras de ácido nucleico se denominan equivalentes funcionales de una secuencia de ácido nucleico, y están incluidas en la invención. El término "equivalente funcional de una secuencia de ácido nucleico" también abarca una cadena que comprende nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques estructurales no nucleotídicos que tienen la misma función que los nucleótidos naturales.

20 La invención proporciona, además, una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende:

- una secuencia CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 13, y/o
- 25 - una secuencia CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 14, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 15, y/o
- 30 - una secuencia CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 9, y/o
- una secuencia CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 10, y/o
- una secuencia CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 11. Una molécula de ácido nucleico según la invención comprende preferentemente una secuencia que tiene al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 96 %, con mayor preferencia al menos 97 %, con mayor preferencia al menos 98 %, con mayor preferencia al menos 99 % de identidad de secuencia con dichas secuencias de CDR. Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 16 y/o comprende una secuencia de cadena ligera que comprende una
 40 secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12, con mayor preferencia al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 96 %, con mayor preferencia al menos 97 %, con mayor preferencia al menos 98 %, con mayor preferencia al menos 99 % de identidad con la SEC ID NO: 12 y/o la SEC ID NO: 16.

45 La invención proporciona, además, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Un vector preferido es un plásmido. Un "plásmido" se define en la presente descripción como una molécula de ADN circular, preferentemente bicatenaria. Los métodos para preparar un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención son bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de vectores adecuados para generar un vector de la invención son vectores retrovirales y lentivirales. Un vector de acuerdo con la invención puede usarse para una variedad de aplicaciones. Un vector de acuerdo con la invención se usa preferentemente para la expresión *in vitro* de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula, preferentemente para la generación de anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la invención. Además, un vector de acuerdo con la invención que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede usarse terapéuticamente. La administración de dicho vector a un individuo, preferentemente un ser humano que lo necesite, da como resultado la expresión de un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención *in vivo*.

55 Además, se proporciona una célula recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Tal molécula de ácido nucleico o vector se introduce preferentemente en dicha célula de modo que la maquinaria de traducción de ácido nucleico de la célula produzca los anticuerpos o fragmentos codificados. Una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención se expresa preferentemente en las llamadas células productoras tales como, por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), NSO (un mieloma de ratón) o la línea celular 293 (T), algunas de las cuales están adaptadas a la producción comercial de anticuerpos. La proliferación de tales células productoras da como resultado una línea celular productora capaz de producir anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la invención. Preferentemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir anticuerpos para uso en seres humanos. Por lo tanto, dicha línea celular productora está preferentemente libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos.

5 La invención proporciona, además, un método para producir un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención que comprende proporcionar una célula con una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención, y permitir que dicha célula traduzca la secuencia de ácido nucleico comprendida por dicha molécula de ácido nucleico o vector. De este modo se produce dicho anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención. Un método de acuerdo con la invención preferentemente comprende, además, recoger, purificar y/o aislar dicho anticuerpo o fragmento. También se proporcionan anticuerpos o fragmentos que se obtienen con un método para producir un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención.

10 Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención puede usarse ventajosamente en aplicaciones terapéuticas. Así, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención y al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitantes de portadores adecuados son, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero (por ejemplo, BSA o RSA) y ovalbúmina. Un portador preferido es una solución, tal como una solución acuosa, por ejemplo, solución salina, o una solución a base de aceite. Ejemplos no limitantes de excipientes que pueden incorporarse en tabletas, cápsulas y similares son un aglutinante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina, un excipiente tal como celulosa microcristalina, un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón pregelatinizado y ácido algínico, un lubricante tal como estearato de magnesio, un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, y un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o cereza. Cuando la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener preferentemente, además de uno o más de los excipientes indicados anteriormente, un portador líquido, tal como un aceite graso. Otros materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas pueden recubrirse con goma laca y/o azúcar, o ambas. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es adecuada preferentemente para uso humano.

30 Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente descripción pueden administrarse en una variedad de formas diferentes. Los ejemplos incluyen administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y que contiene un portador farmacéuticamente aceptable por vía oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal e intracraneal. Para la administración oral, el ingrediente activo puede administrarse en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, tabletas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, como elixires, jarabes y suspensiones. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional mediante la disolución o suspensión del anticuerpo o fragmento de la invención en un vehículo para inyección, tal como agua o un aceite natural como el aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, etc., o un vehículo graso sintético como el oleato de etilo. También pueden incorporarse tampones, conservantes y/o antioxidantes.

40 La invención proporciona, además, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención para uso en terapia. Además, se proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para uso en terapia. Dicha terapia puede ser terapéutica o profiláctica. Los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para el tratamiento, el alivio o la prevención de un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento. También se proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento. Como se usa en la presente descripción, "un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento" se define en la presente descripción como un trastorno en el que la activación no deseada y/o excesiva de la vía alternativa del complemento conduce al daño celular, tisular o de la matriz extracelular. Las células que pueden dañarse por la activación no deseada y/o excesiva de la vía alternativa son cualesquiera células que estén en contacto con la sangre, por ejemplo, glóbulos rojos, células epiteliales, en particular células epiteliales hepáticas y/o renales, plaquetas, glóbulos blancos, células endoteliales. Dicho trastorno preferentemente es un trastorno asociado con una función alterada de FH o con deficiencia de FH. Con mayor preferencia, dicho trastorno es un trastorno asociado con una función alterada de FH o con deficiencia de FH, pero no con ausencia de FH. Dado que los anticuerpos y fragmentos de la invención potencian la función de FH, los anticuerpos y fragmentos son particularmente adecuados para bloquear o reducir los efectos de la función alterada de FH o la deficiencia de FH. Sin embargo, como se demuestra en los Ejemplos, los anticuerpos potenciadores anti-FH de la invención no solo inhiben la lisis de los glóbulos rojos que se incuban con suero de pacientes con activación de la vía alternativa comprometida, sino también de los glóbulos rojos que se incuban con suero de individuos sanos en los que la FH está bloqueada artificialmente. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos también pueden usarse para bloquear o reducir la activación no deseada y/o excesiva de la vía alternativa del complemento causada por factores distintos a la función alterada de FH o la deficiencia de FH. Ejemplos no limitantes de tales órdenes que pueden tratarse son el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN).

65 El síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), también conocido como HUS mediado por complemento, se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia, microangiopatía trombótica sistémica (TMA) e insuficiencia renal. La aparición de aHUS suele ser en la infancia y los episodios de la enfermedad se asocian, por ejemplo, con infecciones, embarazos,

5 otras enfermedades, cirugías o traumas. Más de 60 % de los pacientes con aHUS mueren o desarrollan enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) a pesar del intercambio de plasma o la suplementación con plasma. Se han identificado varias mutaciones en los componentes o factores del sistema del complemento en pacientes con aHUS. Las mutaciones en FH, FI, FB, proteína cofactor de membrana (MCP), trombomodulina (THBD) o C3 comprenden aproximadamente 50 % de las mutaciones conocidas en pacientes con aHUS, cuyas mutaciones de FH son las más frecuentes (alrededor del 20-30 % de los pacientes con aHUS). La mayoría de los pacientes son heterocigotos para las mutaciones, lo cual, así y todo, resulta en una deficiencia patológica de FH. Además, en aproximadamente 10 % de los pacientes el aHUS es causado por autoanticuerpos contra FH, lo que también resulta en una FH funcional reducida. Actualmente, el tratamiento estándar para aHUS es la suplementación con plasma o la terapia de intercambio de plasma. Además, el eculizumab se usa en el tratamiento de pacientes con aHUS. El trasplante renal se asocia con un alto riesgo de recidiva que depende de la mutación subyacente al aHUS. El trasplante está contraindicado en niños con mutaciones en FH, FB, FI, C3 o THBD debido al mayor riesgo de recurrencia. Los anticuerpos o fragmentos, que comprenden preferentemente al menos el fragmento Fab, de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para el tratamiento, alivio o prevención del aHUS causado por una mutación en FH o por la presencia de autoanticuerpos anti-FH. Sin embargo, dado que los anticuerpos y fragmentos de la invención también potencian la actividad de FH en ausencia de una función de FH alterada o de una deficiencia de FH, cualquier forma de aHUS dependiente del complemento puede tratarse, aliviarse o prevenirse ventajosamente con los anticuerpos o fragmentos de la invención.

20 La hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) se debe a una mutación genética en el cromosoma X de una célula madre hematopoyética totipotente. La mutación conduce a una deficiencia en la proteína clase A fosfatidilinositolglicano, que es crítica para la síntesis de proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI-AP) de anclaje a la membrana. El inhibidor del sistema de complemento CD55 es un ejemplo de tal proteína, que se une a C3b en la superficie de la célula huésped y evita así la formación de la convertasa C3. Por lo tanto, una deficiencia de estas proteínas da como resultado una activación no deseada o excesiva del complemento. Una de las principales consecuencias de la PNH es que los glóbulos rojos sufren lisis como resultado de la actividad excesiva del sistema del complemento. Recientemente, eculizumab ha sido aprobado para el tratamiento de la PNH en varios países. Otras terapias incluyen transfusión de sangre, terapia con agentes estimulantes de eritrocitos, tratamiento con corticosteroides y esteroides anabólicos. Dado que los anticuerpos y fragmentos de la invención preferentemente también potencian la actividad de FH independientemente de los niveles de FH o de la función de FH, se inhibe así la activación de la vía alternativa del sistema del complemento, los anticuerpos y el fragmento pueden usarse ventajosamente en pacientes con PNH. Además, debido a que los anticuerpos y fragmentos de la invención actúan a nivel de la deposición de C3, a diferencia del eculizumab que actúa más abajo de las vías de activación, el agotamiento de las células en el hígado se reduce porque C3b opsoniza menos células.

35 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es un daño a la retina que afecta usualmente a los individuos de mayor edad, lo que ocasiona una pérdida de la visión en la mácula, el centro del campo visual. Las mutaciones y los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) en FH se han implicado recientemente en aproximadamente 35 % de los pacientes con AMD. El SNP está ubicado en el CCP7 de FH y se demostró que influye en la unión de FH a la heparina, lo cual compromete la capacidad de FH para unirse a la superficie de la célula huésped, así como a la matriz extracelular. Los anticuerpos o fragmentos, que comprenden preferentemente al menos el fragmento Fab, de acuerdo con la invención, son particularmente adecuados para el tratamiento, alivio o prevención de AMD caracterizada por una función disminuida de FH, preferentemente por un SNP en el gen que codifica FH.

45 La glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) es una causa poco frecuente de nefritis crónica que se presenta principalmente en niños y adultos jóvenes. Causa lesión glomerular como resultado de la proliferación de células mesangiales y endoteliales y la expansión de la matriz mesangial, engrosamiento de las paredes capilares periféricas por depósitos inmunitarios subendoteliales y/o depósitos densos intramembranosos, e interposición mesangial hacia la pared capilar. MPGN a menudo se asocia con una ausencia total de FH. La MPGN que puede tratarse con anticuerpos y/o fragmentos de las invenciones se asocia preferentemente con una función de FH alterada o con deficiencia de FH, pero no con la ausencia de FH. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento o molécula de ácido nucleico para uso de acuerdo con la invención en el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste en síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). También se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento, una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento. Dicho trastorno se selecciona preferentemente del grupo que consiste en síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). Los anticuerpos preferidos para uso como un medicamento o agente profiláctico de acuerdo con la invención son anticuerpos o fragmentos de los mismos, preferentemente el fragmento Fab, Fab' o F(ab)₂ o F(ab')₂, que comprende la cadena pesada y ligera CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 1. Dicho anticuerpo o fragmento es preferentemente un anticuerpo o fragmento monoclonal humanizado o quimérico.

65 La invención proporciona además un método para inhibir la activación alternativa del complemento que comprende administrar a un individuo un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, o una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además un método para tratar, aliviar o prevenir un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención. También se proporciona un método para tratar, aliviar o prevenir un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Además, se proporciona un método para tratar, aliviar o prevenir un trastorno asociado con la activación de la vía alternativa del complemento que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Dicho trastorno se selecciona preferentemente del grupo que consiste en síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). Como se usa en la presente descripción, un "individuo" es un ser humano o un animal que tiene un sistema de complemento como parte de su sistema inmunitario, preferentemente un mamífero. En una modalidad particularmente preferida, el individuo es un ser humano. Los anticuerpos preferidos para uso en los métodos de la invención son anticuerpos o fragmentos de los mismos, preferentemente fragmento Fab, Fab', F(ab)₂ o F(ab')₂, que comprende la cadena pesada y ligera CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestra en la Tabla 1. Dicho anticuerpo o fragmento es preferentemente un anticuerpo o fragmento monoclonal humanizado o quimérico.

Las composiciones que contienen los anticuerpos, fragmentos, moléculas de ácido nucleico de la invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos, fragmentos, moléculas de ácido nucleico o composiciones de acuerdo con la invención se administran a un individuo, preferentemente un ser humano, que ya padece una enfermedad y/o ya muestra síntomas de la enfermedad en una cantidad suficiente para contrarrestar los síntomas de la enfermedad y/o sus complicaciones. En aplicaciones profilácticas, los anticuerpos, fragmentos, moléculas de ácido nucleico o composiciones de acuerdo con la invención se administran a un individuo, antes de que el individuo muestre los síntomas del trastorno para prevenir el desarrollo de estos síntomas o sus complicaciones. Por ejemplo, los individuos que portan una mutación genética que puede o que causará un trastorno asociado con la activación alternativa del complemento pueden tratarse profilácticamente con anticuerpos, fragmentos, moléculas de ácido nucleico o composiciones de acuerdo con la invención. Los anticuerpos, fragmentos o moléculas de ácido nucleico están presentes típicamente en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en una cantidad terapéutica, que es una cantidad suficiente para remediar un trastorno, particularmente los síntomas asociados con un trastorno asociado con la activación no deseada o excesiva de la vía alternativa del sistema del complemento.

Las características pueden describirse en la presente descripción como parte de los mismos aspectos o modalidades de la presente invención, o por separado, con el propósito de claridad y una descripción concisa. El experto en la técnica apreciará que el alcance de la invención puede incluir modalidades que tienen combinaciones de todas o algunas de las características que se describen en la presente descripción como parte de las mismas modalidades o como modalidades separadas.

La presente invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos del anticuerpo anti-FH.07 (numeración de CDR según el sistema de numeración IMG T (Lefranc 1997, Lefranc 1999 y Lefranc y otros 2003).

SEQ NO	ID aminoácido / ácido nucleico	Identidad	Secuencia IMG T con indicación de posiciones de aminoácidos / ácidos nucleicos	Secuencia
1	aminoácido	Cadena ligera CDR1 (cadena ligera CDR 1-IMG T)	SSVKY	SSVKY
2	aminoácido	Cadena ligera CDR2 (cadena ligera CDR2-IMG T)	AT.....S	ATS
3	aminoácido	Cadena ligera CDR3 (cadena ligera CDR3-IMG T)	QQWSI...IPPT	QQWSIIPPT
4	aminoácido	Región variable de cadena ligera (V-D-J-REGION-IMG T)	QIVLSQSPFLSASPEGEKVTVTCTFKYMHWYQQKPGASPKPWISNLASGVP.ARFSGSG...SC ISRVEAEDAATYYCQQWSI.....I GTKLELK	QIVLSQSPFLSASPEGEKVTVTCTCRASS SVKYMHWYQQKPGASPKPWFATSNLA SGVPAFPFGSGSGTYSYSLTISRVEAED AATYYCQQWSIIPPTFGNGTKLELK
5	aminoácido	Cadena pesada CDR1 (cadena pesada CDR1-IMG T)	DFSL....ARYG	DFSLARYG
6	aminoácido	Cadena pesada CDR2 (cadena pesada CDR2-IMG T)	IWSG...GTA	IWSGGTA
7	aminoácido	Cadena pesada CDR3 (cadena pesada CDR3-IMG T)	ARNFGN..YAVDY	ARNFGNYAVDY
8	aminoácido	Región variable de cadena pesada (V-D-J-REGION-IMG T)	QVQLQQSGP.GLVQPSQSLSTTC:ARYGVHWRQSPGKGLEWLG ..GTADYNAAFI.SRLNINKDNSI MNSLQANDTAIYYCARNFGN..YI QGTS	QVQLQQSGPGLVQPSQSLSTTCIVSDF SLARYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSG GTADYNAAFISRLNINKDNSKQVFFK MNSLQANDTAIYYCARNFGNYAVDYWG QGTS
9	ácido nucleico	Cadena ligera CDR1 (cadena ligera CDR1-IMG T)	tcaagtgtc..... aaatac	tcaagtgtcaatac
10	ácido nucleico	Cadena ligera CDR2 (cadena ligera CDR2-IMG T)	gccaca.....tcc	gccacatcc

Continuación

SEQ ID NO	aminoácido / ácido nucleico	Identidad	Secuencia IMGT con indicación de posiciones de aminoácidos / ácidos nucleicos	Secuencia
11	ácido nucleico	Cadena ligera CDR3 (cadena ligera CDR3-IMGT)	cagcagtgaggatt..... ccaaccacg	cagcagtgaggattatcccaccacg
12	ácido nucleico	Región variable de cadena ligera (V-D-J-REGION-IMGT)	caaatgttctctcccagctcc ctgtctgcatctccaggtgagaa gtgacttgccagggccagttcaag tggatatcagcagaaaaccaggagc aaacctggatttttgcaca.. gtccct...gctcgcttcagtgg atcagcagagtgagggtgaaga acttattactgccagcagtgagg gggaccaagctggagctgaaac	caaatgttctctcccagctccaaaca ttcctgtctgcatctccaggtgagaaag gtcacagtgacttgccagggccagttca agtgtcaaatacatgcaactggtatcag cagaaaccaggagcctccccaaacccc tggatttttgcacatccaaacctggct tctggagtcctgctcgcttcagtggc agtgggtctggacctcttattctctc acaatcagcagagtgaggctgaagat gctgccacttattactgccagcagtg agtattatcccaccacgcttcggtaat gggaccaagctggagctgaaac
13	ácido nucleico	Cadena pesada CDR1 (cadena pesada CDR1-IMGT)	gatttctcatta..... tatggt	gatttctcattagctaggtatggt
14	ácido nucleico	Cadena pesada CDR2 (cadena pesada CDR2-IMGT)	atatggagtggt..... a	atatggagtggtggaaccgca

Continuación

SEQ ID NO	aminoácido / ácido nucleico	Identidad	Secuencia IMGT con indicación de posiciones de aminoácidos / ácidos nucleicos	Secuencia
15	ácido nucleico	Cadena pesada CDR3 (cadena pesada CDR3-IMGT)	gcagaaaattttggtaac.....gtggactac	gcagaaaattttggtaactacgctgtg gactac
16	ácido nucleico	Región variable de cadena pesada (V-D-J-REGION-IMGT)	caggtgcagctgcagcagtcagg; ggcctagtgagccctctcagagi attacctgcacagctctctgattt;gctaggtatgg; tggattcgccagctccaggaaa; gaglggctgggagtgatctggagggaaccgcagactataa; ttcata...tccagactgaacat gacaattccaagagccaagtttt atgaacagctccaagctaatga atataattactgtgccagaaaattttaagctgtggactactg ggaacctcag	caggtgcagctgcagcagtcaggacct ggcctagtgagccctctcagagcctg tccattacctgcacagctctctgatttc tcaattagctaggtatgggtacactgg attcgccagctccaggaaaagggtctg gaglggctgggagtgatctggagtggt ggaaccgcagactataatgcagctttc atataccagactgaacatcaacaaggac aatccaagagccaagtttcttataaa atgaacagctccaagctaatgaacaca gccatataattactgtgccagaaaattt ggttaactacgctgtggactactggggt caaggaaacctcag

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Caracterización del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-FH.07. Anti-FH.07 se dirige contra CCP 18 según lo indicado por la unión a los dominios de CCP FH recombinante 15-18, 15-19 y 18-20.

5 Figura 2: Anti-FH.07 inhibe la lisis de SRBC que fue inducida por AcM anti-FH.09 (por bloqueo de AcM contra CCP 6) en suero de donante sano. A. Titulación de anti-FH.09 para inducir la lisis de SRBC, inhibida por una cantidad fija de anti-FH.07 (500 nM). B. Cantidad fija de anti-FH.09 (8.5 µg/ml) para inducir lisis subóptima, inhibida por cantidades crecientes de anti-FH.07.

10 Figura 3: A, B. Anti-FH.07 y F(ab')₂ y Fab' y sus fragmentos inhiben la activación de la vía alternativa, medida por la deposición de C3, en el recubrimiento de cimosán y LPS. A. Titulación sérica en cimosán, cantidad fija de anti-FH.07 (intacto, F(ab')₂, Fab', 500 nM). B. Dilución de suero fija en LPS, titulación de anti-FH.07 (intacto, F(ab')₂, Fab'). C. Formación de uniones cruzadas de FH determinada en un ELISA puente. Fab' no puede formar uniones cruzadas con FH.

15 Figura 4: La lisis de SRBC debida a insuficiencia de FH funcional en suero de pacientes con aHUS puede inhibirse con anti-FH.07 (ya sea intacto, F(ab')₂ o fragmentos Fab'). B,C. 10 % (v/v) de suero en MgEGTA + 100 µg/ml de anticuerpo intacto, F(ab')₂ o fragmentos Fab'.

20 Figura 5: A. Anti-FH.07 aumenta la unión de FH a C3b según lo medido por ELISA. B, C, D. Sensogramas del análisis SPR de las interacciones de FH con (B) C3b, (C) iC3b y (D) C3d. La adición de fragmentos Fab' anti-FH.07 aumentó la RU medida al menos 2 veces en todas las superficies, lo que refleja un aumento de la unión de FH.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

25 Reactivos

El factor H humano purificado se obtuvo de CompTech. (Tyler, Texas EE.UU.). Se obtuvo una cadena kappa anti-ratón generada en rata (RM19) de Sanquin (Business Unit reagents, Sanquin, Amsterdam, Países Bajos). El tampón ELISA de alto rendimiento (HPE) se obtuvo de Sanquin. Se obtuvo el policlonal de conejo anti-factor H humano de Sanquin, el policlonal de cabra anti-FH humano se obtuvo de Quidel. Los CCP recombinantes de FH (CCP 1-4, CCP 1-7, CCP 6-8, CCP 8-15, CCP 12-13, CCP 15-18, CCP 15-19, CCP 18-20 o CCP 19-10) fueron un amable regalo del Dr. Christoph Schmidt y se produjeron como se describió anteriormente (Schmidt y otros 2008). Los anticuerpos monoclonales de ratón para FH se hicieron como se describe a continuación. Anti-FH.07 (IgG1 murino) se dirige contra CCP 18, anti-FH.09 (IgG1 murino) se dirige contra CCP 6. Se usó anti-IL-6.8 como control de isotipo no relacionado y se obtuvo de Sanquin. El AcM anti-C3.19 reacciona con un epítipo en el fragmento C3d de la molécula y se ha descrito anteriormente (Wolbink y otros 1993).

Inmunización y generación de hibridomas

40 Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón contra el factor H mediante la inmunización de ratones BALB/c por vía intraperitoneal con 25 µg de factor H humano, en montanida como adyuvante, a intervalos de cuatro semanas. Tres días después de la cuarta inmunización de refuerzo, las células de bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma SP2/0. La presencia de anticuerpos específicos para el factor H en los sobrenadantes de los hibridomas se probó mediante ELISA. En resumen, las placas de microtitulación se recubrieron con un AcM kappa anti-ratón generado en rata (RM19) para capturar anticuerpos IgG de ratón. La especificidad de los anticuerpos se determinó mediante el factor H biotinilado. El ensayo se desarrolló con estreptavidina-HRP y TMB.

Mapa de epítipos de los AcM

50 La reactividad de los AcM específicos de FH se probó con fragmentos de FH humanos recombinantes compuestos de múltiples CCP. Con este fin, se mezclaron cincuenta microlitros de AcM anti-FH a 100 µg/ml con 0.5 ml de sefarosa acoplada a RM-19 a 2 mg/ml (25 µg de AcM por 1 mg de CnBr-Sefarosa). Los fragmentos de FH se marcaron con ¹²⁵I y se agregaron 100 µl (20000 c/30 seg) a cada muestra, seguido de incubación durante toda la noche. El ensayo se realizó en PBS con Tween-20 al 0.1 % (p/v) y BSA (PTB) al 0.1 % (p/v). Las muestras se lavaron 5 veces con PBS con Tween-20 al 0.1 % (p/v) y se contaron durante 30 segundos. La radioactividad de la sefarosa se midió y se comparó con la entrada total (establecida en 100 %).

Generación de fragmentos F(ab')₂ y Fab' de anticuerpos monoclonales

60 Para hacer fragmentos F(ab')₂ de los AcM anti-FH se incubaron 5.2 mg de cada anticuerpo en 5.2 ml de ácido cítrico/tampón citrato trisódico 0.1 M, pH 3.7, con pepsina (20 µg/ml) (Sigma P-6887) durante 16 horas a 37 °C. A continuación, se agregaron cloruro de sodio 3 M y TRIS 1 M y el pH se ajustó a 8.9. Se usó una columna de protA sefarosa para eliminar los anticuerpos intactos restantes y/o los fragmentos Fc. Para hacer fragmentos Fab' monovalentes, los fragmentos F(ab')₂ se redujeron mediante incubación con ditioeritritol 10 mM durante 60 min. Posteriormente, los grupos tiol libres se bloquearon con 20 mM de yodoacetamida. Los fragmentos se dializaron a PBS y la eficacia de escisión se comprobó en SDS-PAGE.

Ensayo hemolítico SRBC

5 La funcionalidad del factor H se midió mediante el uso de un ensayo hemolítico como se describió anteriormente por Sanchez-Corral y otros. (2004) y Wouters y otros. (2008) con algunos ajustes. Los glóbulos rojos de las ovejas (SRBC) se diluyeron en tampón veronal (barbital 3 mM, barbital sódico 1.8 mM, NaCl 145, pH 7.4 (VB)) suplementado con 5.8 % (p/v) de sacarosa (VBS) hasta una concentración final de 2.1×10^8 células/ml. El suero humano combinado normal o el suero de un paciente con aHUS se diluyó al 20 % (v/v) en un tampón veronal que contenía gelatina al 0.05 % (p/v), MgCl₂ 10 mM, EGTA 20 mM (VBG-AP) con o sin la adición AcM anti-FH en concentraciones apropiadas. El ensayo se realizó mediante la mezcla de 50 µl de muestra de suero con 50 µl de suspensión de SRBC para alcanzar una concentración final de suero al 10 % (v/v) con 1.05×10^8 células/ml en MgCl₂ 5 mM, EGTA 10 mM, seguido de incubación a 37 °C durante 1.25 horas mientras se agita a 200 rpm. La lisis se detuvo mediante la adición de 100 µl de VB helado que contenía EDTA 20 mM seguido de centrifugación en una centrífuga previamente enfriada (7 °C) a 1800 rpm durante 2.5 minutos. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 412 nm en un lector de microplacas Synergy 2 (BioTek). La lisis de cada muestra se expresó como porcentaje en comparación con el control de lisis del 100 % (SRBC incubados en H₂O con 0.6 % (p/v) Saponina). Como control negativo, los SRBC se incubaron con suero diluido en VB suplementado con EDTA 10 mM para prevenir la activación del complemento.

Deposición de C3 en cimosán y LPS

20 Las placas de microtitulación se recubrieron con cimosán (100 µg/ml en PBS recubierto toda la noche a temperatura ambiente en microplacas de 96 pocillos Nunc polysorp) o *Salmonella typhosa* LPS (Sigma L-6386, 40 µg/ml en PBS recubierto con toda la noche a temperatura ambiente en placas de microtitulación de 96 pocillos Nunc polysorp). Después de lavar con PBS/Tween, el suero del donante sano humano se incubó en tampón Veronal que contenía gelatina al 0.05 % (p/v), MgCl₂ 5 mM, EGTA 10 mM y Tween-20 0.1 % (p/v) en presencia o ausencia de AcM anti-FH o fragmentos de anticuerpos en las concentraciones indicadas. La deposición de C3 se detectó con AcM anti-C3.19 biotilado (0.55 µg/ml en HPE), seguido de incubación con estreptavidina al 0.01 % (v/v) conjugada con poli-HRP, en HPE.

Factor H de unión a C3b

30 C3b se recubrió toda la noche en una placa de microtitulación de ELISA (40 µg/ml en tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9.6). El suero de donante sano (diluido 1: 8 en PBS/BSA/poloxámero/EDTA) se incubó previamente con AcM anti-FH (100 µg/ml) durante 2.5 horas a temperatura ambiente antes de la incubación en la placa recubierta con C3b. La FH unida se detectó con policlonal anti-FH de cabra marcado con peroxidasa. Se desarrolló ELISA (1 µg/ml) con TMB.

Análisis SPR de las interacciones de FH con C3b, iC3b y C3d

40 La unión de FH a C3b, iC3b o C3d en presencia de los AcM anti-FH se determinó mediante resonancia de superficie de plasmones mediante el uso de un instrumento Biacore T3000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Se inmovilizaron C3b, iC3b o C3d purificados (Complement Technologies) en una de las tres celdas de flujo de un CM5 Biacore Sensor Chip (GE Healthcare) mediante el uso de un acoplamiento estándar de amina. La celda de flujo restante se usó como superficie de referencia y se preparó mediante la realización de una reacción de acoplamiento sin la adición de ninguna proteína. Se obtuvo una respuesta de 4400 unidades de respuesta (RU), 4180 RU y 1470 RU después del acoplamiento con C3b, iC3b y C3d, respectivamente. Los experimentos SPR se realizaron a 25 °C mediante el uso de una velocidad de flujo de 10 µl/min y en solución salina 150 mM tamponada con HEPES 10 mM, pH 7,4, con Tween-20 al 0.05 % (p/v) (HBS-P). Se realizaron inyecciones duplicadas de FH 0.5 µM con un tiempo de contacto de 210 segundos para obtener una señal de unión de referencia para FH en cada superficie. Después de cada inyección de muestra, se permitió un tiempo de disociación de 240 segundos, mediante el uso de HBS-P como tampón de ejecución, seguido de una única inyección de 30 segundos de NaCl 1 M para regenerar la superficie.

50 Para determinar el efecto del anti-FH.07 sin interferencia de una posible formación de uniones cruzadas a través del AcM, se utilizaron los fragmentos Fab' generados como se describió anteriormente. Los fragmentos Fab' se mezclaron con FH purificada 0.5 µM en una relación molar de 2 a 1 y también se inyectó cada fragmento Fab' sin la adición de FH para determinar cualquier interacción de los fragmentos Fab' con las superficies.

Resultados

Anticuerpos monoclonales

60 Se obtuvieron 21 anticuerpos monoclonales contra FH humana. Los AcM se numeraron siguiendo el orden de identificación. Todos los anticuerpos fueron capaces de capturar FH humana soluble, lo que indica una alta afinidad. Algunos AcM inhiben la actividad del cofactor al bloquear la interacción con el factor I y otros AcM inhiben la unión de FH a las superficies celulares, como lo indica la lisis de SRBC mejorada tras la incubación con suero humano normal. Uno de los AcM inhibidores anteriores (anti-FH.09) se usó en los Ejemplos para inducir *lisis in vitro* de SRBC tras la incubación con suero humano normal. Anti-FH.03 no inhibió FH y se utilizó en los Ejemplos como un anticuerpo de control. Además de inhibir los AcM, identificamos un AcM (anti-FH.07) que mejoró la función de FH.

Mapeo de los sitios de unión de los AcM mediante el uso de fragmentos de FH recombinantes

5 Con el fin de mapear el sitio de unión de anti-FH.07, se probó la reactividad de este AcM hacia un panel de dominios CCP recombinantes radiomarcados o FH humana purificada. La unión de los AcM se probó en un radioinmunoensayo y se relacionó con la entrada (100 %). Como se indica en la Fig. 1, el anti-FH.07 se une a los fragmentos recombinantes CCP 15-18, CCP 15-19 y CCP 18-20, lo que indica que el anti-FH.07 es específico para el CCP 18 de la molécula de FH.

10 Anti-FH.07 inhibe la lisis de SRBC que indujo un AcM bloqueador anti-FH

10 Para investigar el efecto de anti-FH.07 sobre la función del factor H, primero se indujo la lisis de SRBC por un anticuerpo bloqueador contra FH (anti-FH.09). En condiciones normales, la incubación de SRBC con suero de donante humano sano no conduce a la lisis de SRBC, porque estas células están protegidas por el factor H en el suero que se une al ácido siálico en la superficie de SRBC. Tras la incubación de suero humano normal con cantidades crecientes de AcM bloqueador de anti-FH.09, se observó una lisis dependiente de la dosis de SRBC (Fig. 2A). Esto puede explicarse por una protección insuficiente de la superficie celular por el FH del suero. Cuando se agregó una cantidad fija de anti-FH.07, se inhibió la lisis de SRBC. Esto indica que el anti-FH.07 contrarresta el efecto del anti-FH.09 (Fig. 2A).

20 En un experimento adicional, se añadió una cantidad fija de anti-FH.09 al suero de un donante sano para inducir una lisis subóptima de los SRBC (aproximadamente el 60 %). Mediante la adición de cantidades crecientes de anti-FH.07, esta lisis podría bloquearse completamente (Fig. 2B), lo cual muestra nuevamente los efectos opuestos de estos anticuerpos monoclonales.

25 Anti-FH.07 inhibe la deposición de C3 mediada por la vía alternativa en cimosán y LPS

25 Para investigar si anti-FH.07 tiene un efecto sobre la inhibición de la vía alternativa por FH y para excluir un efecto directo sobre los SRBC o sobre la lisis de estas células, se realizó un ensayo de deposición de C3 en cimosán o LPS como activadores de la vía alternativa. Los experimentos se realizaron en MgEGTA tampón veronal para excluir la activación de la vía dependiente de Ca^{2+} o de la vía clásica de la lectina.

30 La incubación de concentraciones séricas crecientes en placas revestidas con cimosán o con LPS dio como resultado una deposición de C3 dependiente de la dosis. Al agregar una cantidad fija de anti-FH.07 (500 nM) a una titulación sérica, se inhibió la deposición de C3 (Fig. 3A), indicada por una curva desplazada hacia la derecha. Este cambio no se observó al agregar al suero la misma cantidad de anti-FH.03, un AcM anti-FH no inhibidor. Esto indica que la función inhibitoria de FH en la activación de la vía alternativa se fortalece mediante la adición de anti-FH.07. Además, al agregar cantidades crecientes de anti-FH.07 a una concentración sérica fija (1:10) en una placa recubierta con LPS, la deposición de C3 podría bloquearse completamente (Fig. 3B).

40 Los fragmentos Fab' de anti-FH.07 tienen el mismo efecto que el AcM intacto

40 Un posible mecanismo para el aumento de la función inhibitoria de la FH observada tras la incubación con anti-FH.07 es la multimerización de la FH mediante la formación de uniones cruzadas a través del anticuerpo, lo que aumenta la avidéz de la FH por la superficie. Para probar esta posibilidad, se generaron fragmentos Fab' monovalentes de anti-FH.07. Si la formación de uniones cruzadas de FH es la causa del aumento observado de la función de FH, se espera que los fragmentos Fab' monovalentes no muestren ningún efecto potenciador. Con un ELISA de puente, primero se verificó si los fragmentos Fab' que se generaron eran de hecho completamente monovalentes y no eran capaces de formar de uniones cruzadas con moléculas de FH. Con este fin, se recubrió una placa ELISA con FH y se usó FH biotinilada para la detección. Como se indica en la Fig. 3C, los fragmentos Fab' que se generaron fueron incapaces de formar uniones cruzadas con FH en el recubrimiento ni en la fase fluida, mientras que los fragmentos $F(ab')_2$ y la IgG intacta fueron capaces de hacerlo. Luego se probaron los fragmentos anti-FH.07 $F(ab')_2$ y Fab' en los ensayos de deposición de C3 en placas recubiertas con cimosán y LPS. Para nuestra sorpresa, se observó el mismo efecto potenciador de los fragmentos Fab' sobre la función de FH. Los fragmentos Fab' anti-FH.07 dieron como resultado la misma disminución de la deposición de C3 que el anticuerpo IgG intacto, tanto en cimosán como en LPS (Fig. 3A y 3B). Por lo tanto, se concluyó que el efecto del anti-FH.07 no se debió a la formación de uniones cruzadas de las moléculas de FH por el anticuerpo monoclonal. Además, esto está subrayado por el hecho de que no se observó ningún efecto potenciador de ningún otro de los 20 anticuerpos monoclonales en nuestro panel.

Anti-FH.07 restaura la función protectora de FH en sueros de pacientes con aHUS

60 La incubación de SRBC con cantidades crecientes de suero de un paciente con aHUS con una mutación conocida en CCP 20 conduce a la lisis de las células debido a una protección insuficiente de las células contra la activación del complemento (Fig. 4A). Sin embargo, aproximadamente la mitad de FH en este suero del paciente es funcional, ya que este paciente (como la mayoría de los pacientes con aHUS) tiene una mutación heterocigótica. Sobre la base de los resultados anteriores, se planteó la hipótesis de que la preincubación del suero del paciente con aHUS con anti-FH.07 conduciría a la potenciación de la función de FH, lo que resultaría en una protección restaurada de los SRBC. De hecho, cuando se incubó el suero de un paciente con aHUS con anti-FH.07, la lisis observada de los SRBC se anuló

completamente (Fig. 4A y 4B), mientras que los anticuerpos de control no mostraron ningún efecto. Este resultado se obtuvo en tres pacientes con aHUS no relacionados, todos los cuales tienen una mutación heterocigótica única en el SCR 20 de FH (Fig. 4B). En línea con los experimentos de deposición de C3 en cimosán y LPS como se describió anteriormente, los fragmentos F(ab')₂ y Fab' de anti-FH.07 también podrían inhibir la lisis de SRBC mediada por el complemento en el suero de este paciente (Fig. 4C).

La unión del factor H a C3b aumentó en presencia de anti-FH.07

Dado que los fragmentos Fab' de anti-FH.07 ejercen el mismo efecto potenciador sobre la función de FH que la IgG intacta, la multimerización de las moléculas de FH por el anticuerpo monoclonal no puede ser la explicación de la potenciación. Se plantea la hipótesis de que tal vez mediante la unión de anti-FH.07 a CCP 18, la conformación de FH cambia de tal manera que aumenta la unión a las superficies. El factor H tiene sitios de unión para C3b y para glucosaminoglicanos, ubicados en diferentes sitios a lo largo de la molécula. Dado que observamos el efecto potenciador de FH en la deposición de C3 en cimosán y LPS, primero se estudió el efecto de anti-FH.07 sobre la unión de FH a C3b. Con este fin, se recubrió una placa de ELISA con C3b y se detectó la FH unida del suero humano normal con anti-FH policlonal marcado con HRP. Como se muestra en la Fig. 5, anti-FH.07 aumentó significativamente la unión de FH a C3b, mientras que otros AcM anti-FH (AcM irrelevante u otros anticuerpos específicos de FH sin efecto potenciador) no tuvieron ningún efecto.

Además, se realizaron experimentos de SPR para estudiar la interacción de FH con C3b, iC3b y C3d en ausencia y presencia de fragmentos Fab' anti-FH.07. Brevemente, se recubrieron tres celdas de flujo de un chip CM5 Biacore Sensor con C3b, iC3b o C3d y se determinaron las interacciones de FH con estas superficies en ausencia o presencia de AcM anti-FH en un sistema Biacore T3000.

En condiciones normales, FH muestra interacciones con C3b y relativamente pequeñas interacciones con iC3b y C3d. La adición de fragmentos Fab' anti-FH.09 o el isotipo control (anti-IL-6.8) no afectó la unión de FH a C3b, iC3b o C3d. Sin embargo, la adición de fragmentos Fab' anti-FH.07 aumentó considerablemente la respuesta en la superficie recubierta con C3b (Fig. 5B). Anti-FH.07 por sí mismo no mostró ninguna interacción con C3b, lo que indica que el aumento medido de la respuesta se debió al aumento de la unión de FH a cada una de las superficies. Incluso la unión a iC3b y C3d, que normalmente es baja para FH nativa, aumentó después de la adición de anti-FH.07 (Fig. 5C y 5D, respectivamente). Las interacciones medidas aumentaron al menos 2 veces en todas las superficies y, por lo tanto, no pudieron explicarse simplemente por el 33 % de aumento esperado en la masa de FH después de unirse a un fragmento de AcM Fab' anti-FH.

Referencias

- Cheng ZZ, Corey MJ, Pärevalo M, Majno S, Hellwage J, Zipfel PF, Kinders RJ, Raitanen M, Meri S, Jokiranta TS. Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin Chem*. 2005;51(5):856-63.
- Corey MJ, Kinders RJ, Poduje CM, Bruce CL, Rowley H, Brown LG, Hass GM, Vessella RL. Mechanistic studies of the effects of anti-factor H antibodies on complement-mediated lysis. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12917-25.
- Lefranc MP, "Unique database numbering system for immunogenetic analysis" *Immunology Today*, 18, 509 (1997). PMID: 9386342.
- Lefranc MP, "The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains", *The Immunologist*. 1999; 7, 132-136.
- Lefranc MP, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, and Lefranc G, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains" *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003). PMID 12477501.
- Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez de Cordoba S, Lopez-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol*, mayo 2004;41(1):81-4.
- Schmidt CQ, Herbert AP, Kavanagh D, Gandy C, Fenton CJ, Blaum BS, Lyon M, Uhrin D, Barlow PN. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. *J Immunol*, 15 de agosto, 2008;181(4):2610-9.
- Wouters D, Brouwer MC, Daha MR, Hack CE. Studies on the haemolytic activity of circulating C1q-C3/C4 complexes. *Mol Immunol*, 2008 Apr;45(7):1893-9. Epub 3 de diciembre, 2007.
- Wolbink GJ, Bollen J, Baars JW, ten Berge RJ, Swaak AJ, Paardekooper J, Hack CE. Application of a monoclonal antibody against a neoepitope on activated C4 in an ELISA for the quantification of complement activation via the classical pathway *J Immunol Methods*, 6 de julio, 1993;163(1):67-76.

Listado de secuencias

- <110> Stichting Sanquin Bloedvoorziening Kuijpers, Taco W. Wouters, Diana Brouwer, Maria C. Pouw, Richard B.
- 5 <120> Anticuerpos específicos del Factor H y sus usos
 <130> P104464EP10
- 10 <140> EP 15787045.2
 <141> 2017-03-07
 <150> EP 14181631.4
 <151> 2014-08-20
- 15 <150> PCT/NL2015/050584
 <151> 2015-08-20
 <160> 16
- 20 <170> Patente versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
- 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera CDR1-IMGT
- 30 <400> 1
 Ser Ser Val Lys Tyr
 1 5
- <210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
- 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera CDR2-IMGT
- 40 <400> 2
 Ala Thr Ser
 1
- <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
- 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera CDR3-IMGT
- 50 <400> 3
 Gln Gln Trp Ser Ile Ile Pro Pro Thr
 1 5
- 55 <210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera V-D-J-REGION-IMGT
 <400> 4

ES 2 739 609 T3

5 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Phe Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Lys Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Lys Tyr Met
 20 25 30
 10 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45
 15 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 20 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 25 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Ile Pro Pro Thr
 85 90 95
 30 Phe Gly Asn Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> cadena pesada CDR1-IMGT
 <400> 5
 Asp Phe Ser Leu Ala Arg Tyr Gly
 1 5
 40 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> cadena pesada CDR2-IMGT
 <400> 6
 Ile Trp Ser Gly Gly Thr Ala
 1 5
 50 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> cadena pesada CDR3-IMGT
 <400> 7
 Ala Arg Asn Phe Gly Asn Tyr Ala Val Asp Tyr
 60 1 5 10
 <210> 8

ES 2 739 609 T3

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada V-D-J-REGION-IMGT

<400> 8

10 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

15 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Asp Phe Ser Leu Ala Arg Tyr
 20 25 30

20 Gly Val His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

25 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Thr Ala Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
 50 55 60

30 Ser Arg Leu Asn Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

35 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

40 Arg Asn Phe Gly Asn Tyr Ala Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

<210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena ligera CDR1-IMGT

45 <400> 9
 tcaagtgtca aatac 15

<210> 10
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena ligera CDR2-IMGT

55 <400> 10
 gccacatcc 9

60 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> cadena ligera CDR3-IMGT

ES 2 739 609 T3

<400> 11
 cagcagtgga gtattatccc acccacg 27

5 <210> 12
 <211> 319
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera V-D-J-REGION-IMGT

<400> 12

15 caaattgttc tctcccagtc tccaacattc ctgtctgcat ctccaggtga gaaggtcaca 60
 gtgacttgca gggccagttc aagtgtcaaa tacatgcact ggtatcagca gaaaccagga 120
 gcctccccca aaccctggat ttttgccaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 20 ttcagtggca gtgggtctgg gacctttat tctctcacia tcagcagagt ggaggctgaa 240
 gatgctgcc a ttattactg ccagcagtgg agtattatcc caccacggt cggtaatggg 300
 accaagctgg agctgaaac 319

25

<210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena pesada CDR1-IMGT

35 <400> 13
 gatttctcat tagctaggta tggt 24

<210> 14
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> (cadena pesada CDR2-IMGT

45 <400> 14
 atatggagtg gtggaaccgc a 21

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> cadena pesada CDR3-IMGT

<400> 15
 gccagaaatt ttgtaacta cgctgtggac tac 33

60 <210> 16
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 65 <223> Región variable de cadena pesada V-D-J-REGION-IMGT

ES 2 739 609 T3

<400> 16

5	caggtgcagc tgcagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctctcagag cctgtccatt	60
	acctgcacag tctctgattt ctcattagct aggtatggtg tacactggat tcgccagtct	120
	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggaaccgc agactataat	180
10	gcagctttca tatccagact gaacatcaac aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt	240
	aaaatgaaca gtctccaagc taatgacaca gccatatatt actgtgccag aaattttggt	300
15	aactacgctg tggactactg gggcaagga acctcag	337

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o un fragmento del mismo que se une específicamente al dominio 18 de la proteína de control del complemento (CCP18) del factor H (FH) y potencia la actividad de FH, en donde dicha actividad de FH es la inhibición de la activación alternativa del complemento, y en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:
 - una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia SEQ ID NO: 5, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia SEQ ID NO: 6 y una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia SEQ ID NO: 7, y
 - una secuencia CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia SEC ID NO: 1, una secuencia CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia SEC ID NO: 2 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia SEC ID NO: 3.
2. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inhibición de la activación alternativa del complemento comprende:
 - una inhibición de la actividad hemolítica,
 - una inhibición de la deposición del componente 3 del complemento (C3) en las células, y/o
 - un aumento de la unión de FH a C3b, iC3b y/o C3d.
3. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho fragmento comprende al menos un fragmento Fab.
4. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo y/o un anticuerpo quimérico o humanizado o fragmento del mismo, que comprende regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada humanas.
5. El anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8 y/o una secuencia de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.
6. Un anticuerpo aislado, sintético o recombinante o fragmento del mismo que compite por la unión con el dominio 18 de la proteína de control del complemento (CCP18) del factor H (FH) con un anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia SEC ID NO: 8 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 y que potencia la actividad de FH, en donde dicha actividad de FH es la inhibición de la activación alternativa del complemento.
7. Una molécula de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
8. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°: 16 y/o que comprende una secuencia de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12.
9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8.
10. Una célula recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico o vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, o un vector de acuerdo con la reivindicación 9, y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una molécula de ácido nucleico o vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, para uso en terapia.
13. Un anticuerpo o fragmento, una molécula de ácido nucleico o un vector para usar de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en el tratamiento, alivio o prevención de un trastorno que se selecciona del grupo que consiste en síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN).
14. Un método para producir un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende proporcionar una célula con una molécula de ácido nucleico o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, y permitir que dicha célula traduzca la secuencia ácido nucleico comprendida por dicha molécula de ácido nucleico o vector, produciendo así dicho anticuerpo o fragmento de

acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende preferentemente, además, la recolección, purificación y/o aislamiento de dicho anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

Figura 1

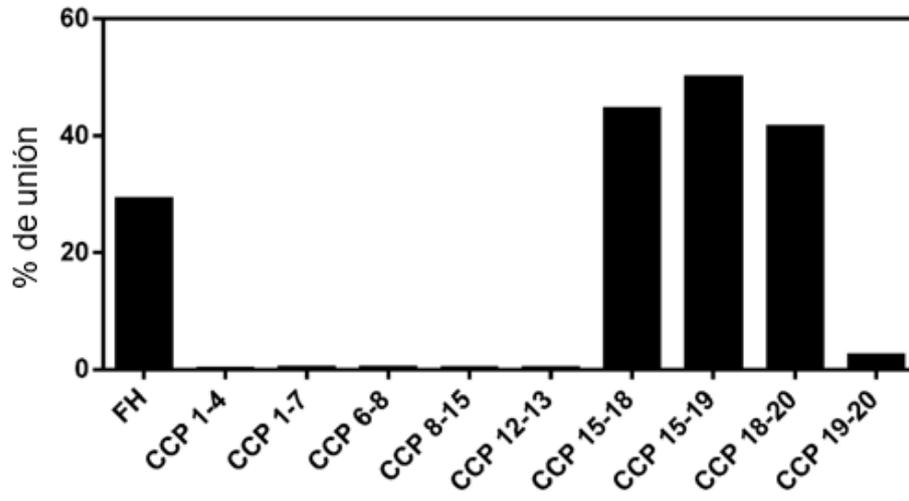
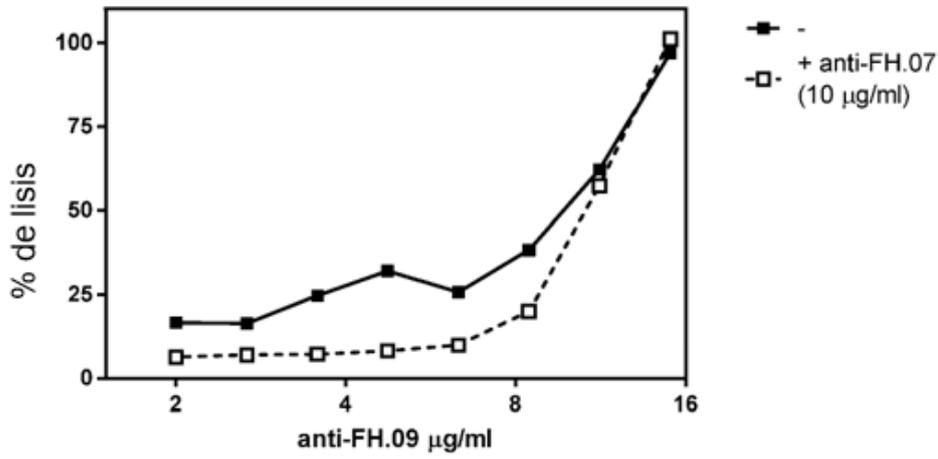


Figura 2

A



B

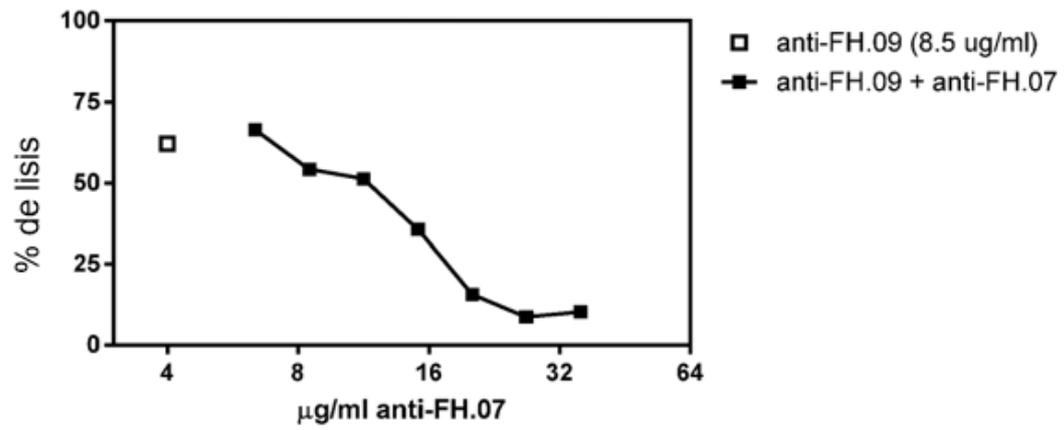
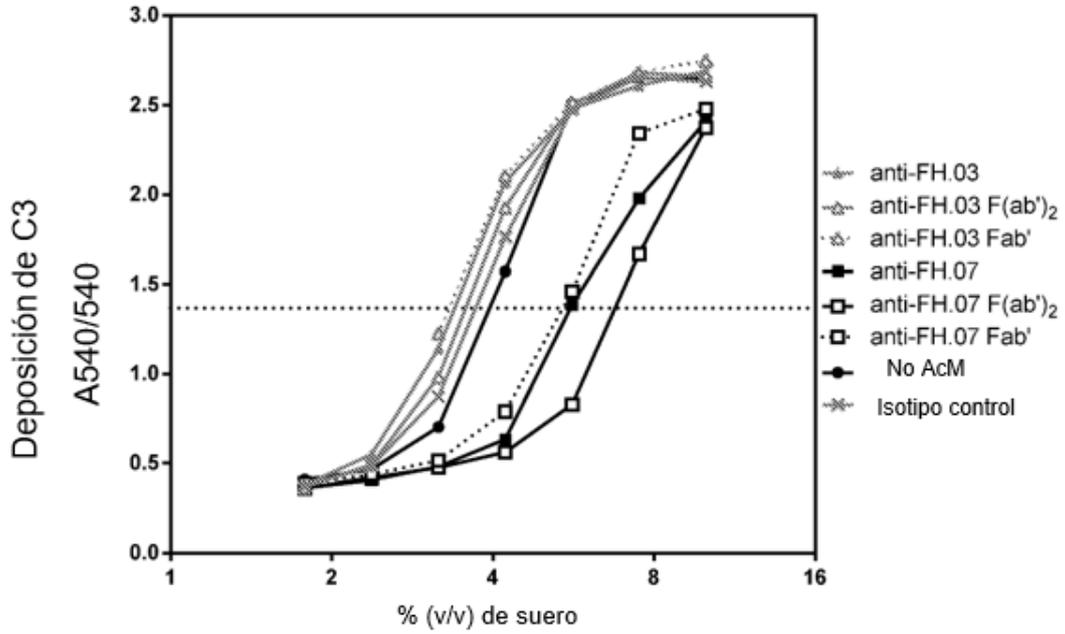


Figura 3

A



B

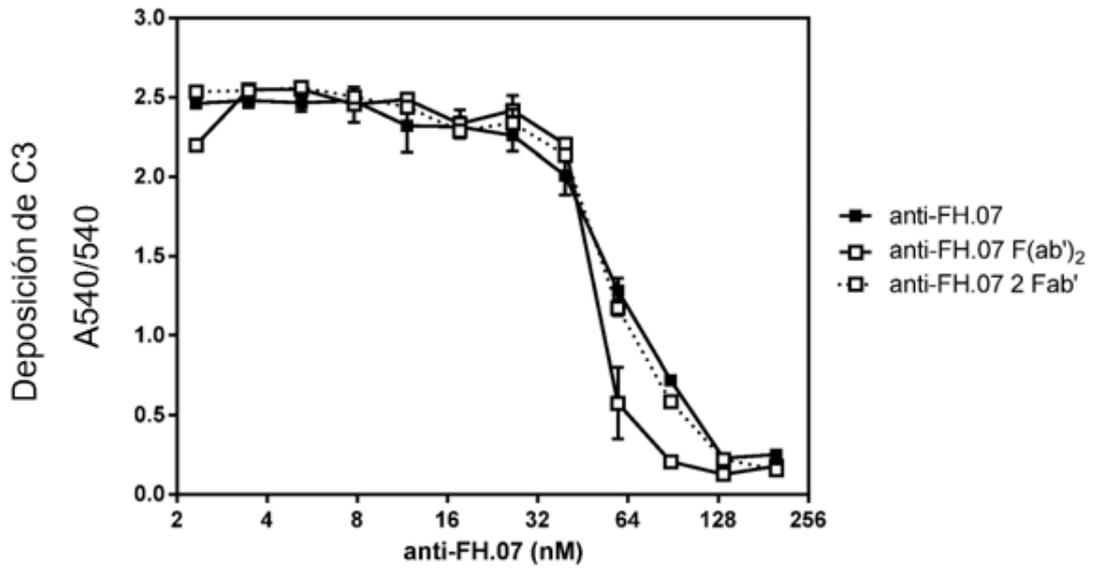


Figura 3 continuación

C

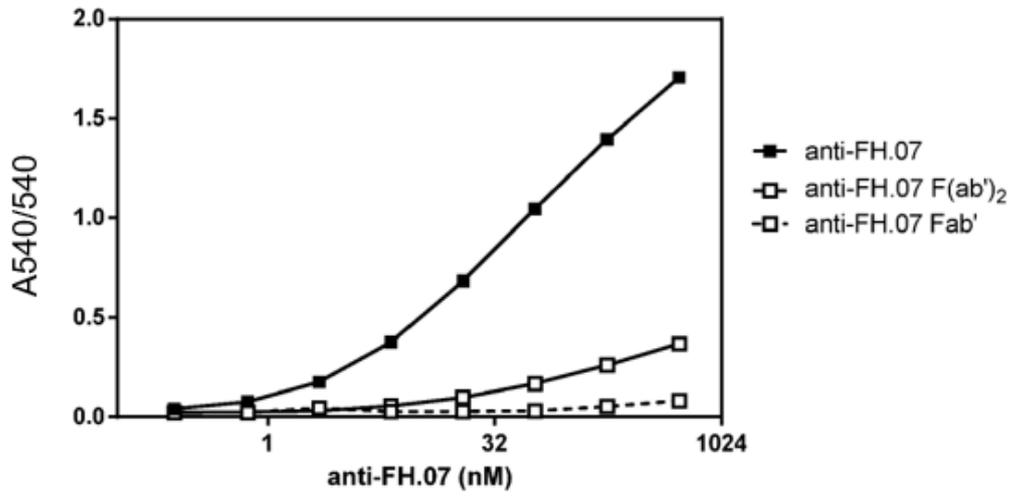
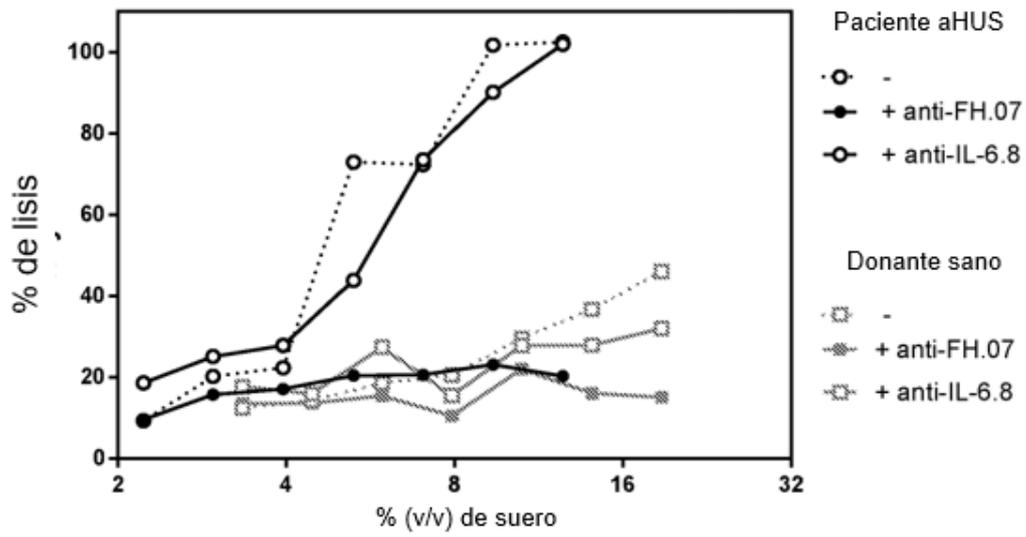


Figura 4

A



B

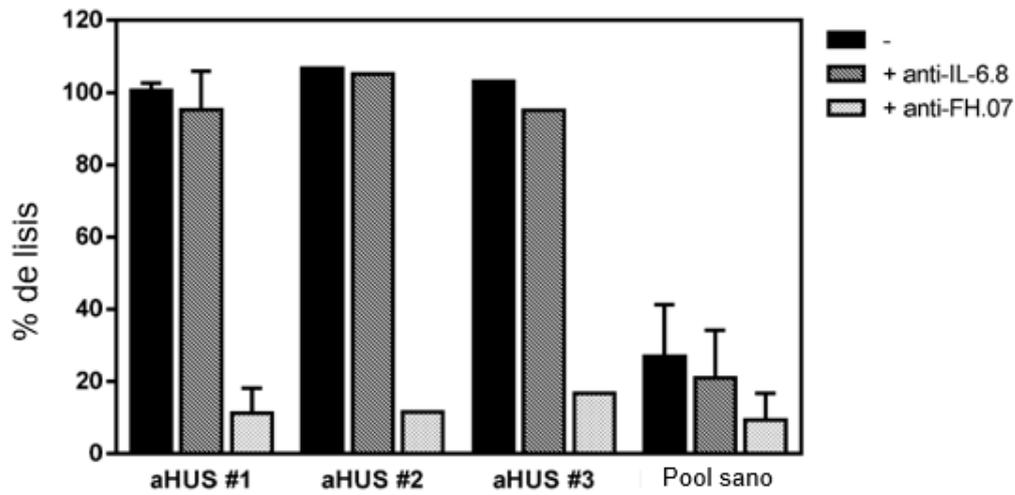


Figura 4 continuación

C

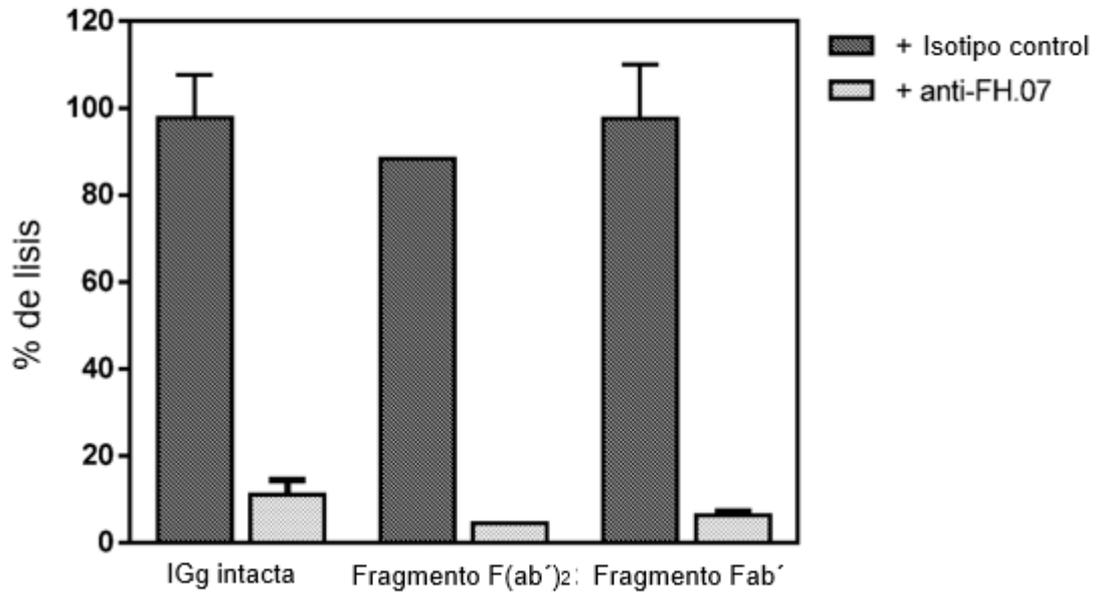
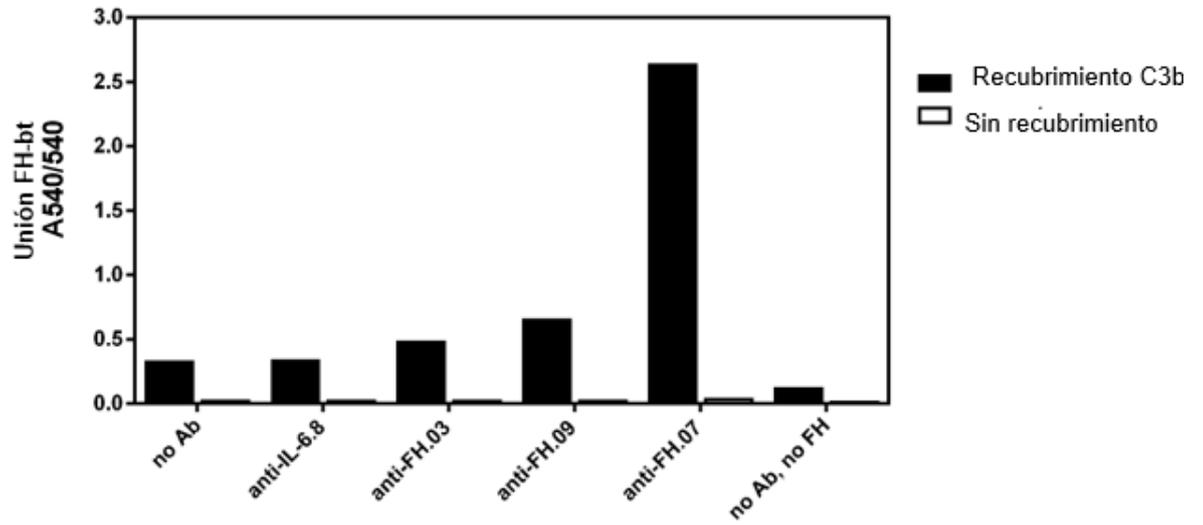


Figura 5

A



B

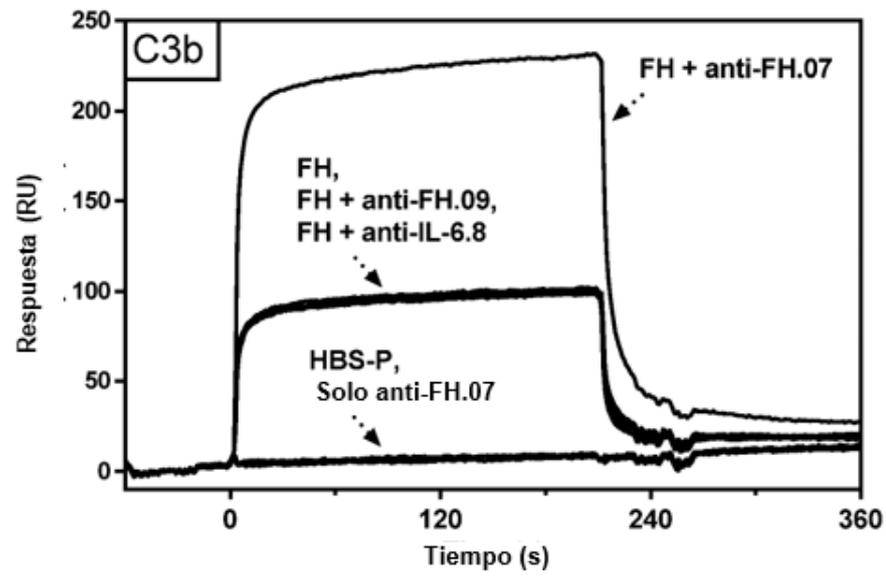
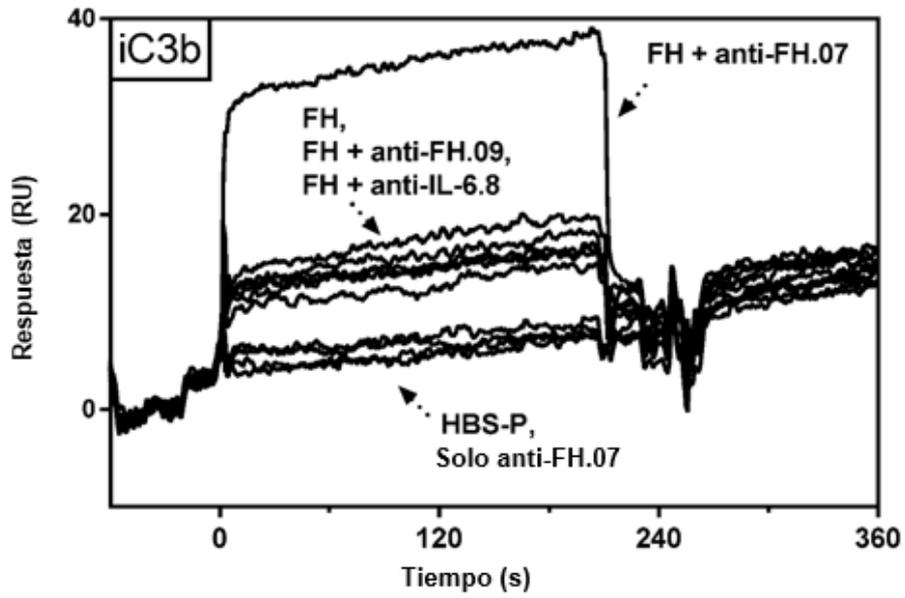


Figura 5 continuación

C



D

