COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE INHIBICIÓN DEL MASP-3 PARA EL TRATAMIENTO DE DIVERSAS ENFERMEDADES Y TRASTORNOS

REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°. 62/369,674, presentada el 1 de agosto de 2016, y reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°. 62/419,420, presentada el 8 de noviembre de 2016, y reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°. 62/478,336, presentada el 29 de marzo de 2017, las cuales por la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN SOBRE LA LISTA DE SECUENCIAS

La lista de secuencias asociada a esta solicitud se proporciona en formato de texto en lugar de una copia en papel y se incorpora por referencia a la especificación. El nombre del archivo de texto que contiene la lista de secuencias es MP_1_0254_US_Sequence_Listing_20170628_ST25; el archivo es de 191 KB; fue creado el 28 de junio de 2017 y se presenta a través de la EFS-Web con la presentación de la especificación.

ANTECEDENTES

El sistema del complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar, amplificar y orquestar la respuesta inmune a la infección microbiana y otras lesiones agudas (M.K. Liszewski y J.P. Atkinson, 1993, en *Fundamental Immunology*, Tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York), en humanos y otros vertebrados. Mientras que la activación del complemento proporciona una valiosa defensa de primera línea contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inmunitaria protectora también pueden representar una amenaza potencial para el huésped (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin*. *Inmunopathol*. *15*:417 431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Investigación clínica 24*:219 228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos C3 y C5 reclutan y activan los neutrófilos. Aunque son indispensables para la defensa del huésped, los neutrófilos activados son indiscriminados en su liberación de enzimas destructivas y pueden causar daño a los órganos. Además, la activación del complemento puede causar la deposición de componentes del complemento lítico en

las células huéspedes cercanas, así como en los objetivos microbianos, lo que da lugar a la lisis de las células huéspedes.

El sistema del complemento también ha sido implicado en la patogénesis de numerosos estados de enfermedades agudas y crónicas, incluyendo: infarto de miocardio, apoplejía, ARDS (Síndrome de dificultad respiratoria aguda – SDRA), lesión por reperfusión, shock séptico, fuga capilar después de quemaduras térmicas, inflamación de bypass postcardiopulmonar, rechazo de trasplante, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia gravis y enfermedad de Alzheimer. En casi todas estas condiciones, el complemento no es la causa, sino uno de los varios factores que intervienen en la patogénesis. Sin embargo, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto efectivo para el control clínico en muchos de estos estados de la enfermedad. El creciente reconocimiento de la importancia de la lesión tisular mediada por complemento en una variedad de estados patológicos subraya la necesidad de medicamentoos inhibidores del complemento eficaces. Hasta la fecha, Eculizumab (Solaris®), un anticuerpo contra la C5 es el único medicamento complementario que ha sido aprobado para uso humano. Sin embargo, la C5 es una de varias moléculas efectoras localizadas "descendente" en el sistema del complemento, y el bloqueo de la C5 no inhibe la activación del sistema del complemento. Por lo tanto, un inhibidor de los pasos de iniciación de la activación del complemento tendría ventajas significativas sobre un inhibidor del complemento "descendente".

Actualmente, es ampliamente aceptado que el sistema del complemento pueda activarse a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía de la lectina y la vía alternativa. La vía clásica suele desencadenarse por un complejo compuesto de anticuerpos del huésped unidos a una partícula extraña (es decir, un antígeno) y, por lo tanto, requiere la exposición previa a un antígeno para la generación de una respuesta específica de anticuerpos. Dado que la activación de la vía clásica depende de una respuesta inmunitaria adaptativa previa del huésped, la vía clásica forma parte del sistema inmunitario adquirido. Por el contrario, tanto la lectina como las vías alternativas son independientes de la inmunidad adaptativa y forman parte del sistema inmunitario innato.

La activación del sistema del complemento resulta en la activación secuencial de los zimógenos de serina proteasa. El primer paso en la activación de la vía clásica es la unión de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a las moléculas IgG e IgM unidas al antígeno. C1q se asocia con las proenzimas de serina proteasa Clr y Cls como un complejo llamado C1. Tras la unión de C1q a un complejo inmunológico, la escisión autoproteolítica del sitio de Arg Ile de Clr es seguida por la escisión mediada por Clr y la activación de Cls, que adquiere así la capacidad de escisión de

C4 y C2. La C4 se escinde en dos fragmentos, designados C4a y C4b, y, de manera similar, C2 se escinde en C2a y C2b. Los fragmentos de C4b son capaces de formar enlaces covalentes con grupos hidroxilos o aminoácidos adyacentes y generar la convertasa C3 (C4b2a) a través de la interacción no covalente con el fragmento C2a de C2 activado. La convertasa C3 (C4b2a) activa la C3 por escisión proteolítica en subcomponentes C3a y C3b que conducen a la generación de la convertasa C5 (C4b2a3b), la cual, al escindir la C5 conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b combinado con C6, C7, C8 y C9, también conocido como "MAC") que puede alterar las membranas celulares resultando en la lisis celular. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan covalentemente en las superficies extrañas del objetivo, que son reconocidas por los receptores del complemento en múltiples fagocitos.

Independientemente, el primer paso en la activación del sistema del complemento a través de la vía de la lectina es también la unión de moléculas de reconocimiento específicas, a la que sigue la activación de las proenzimas de serina proteasa asociadas. Sin embargo, en lugar de la unión de inmunocomplejos por C1q, las moléculas de reconocimiento en la vía de la lectina comprenden un grupo de proteínas de unión de carbohidratos (lectina de unión de manano (MBL), ficolina H, ficolina M, ficolina L, ficolina L y lectina tipo C CL-11), denominadas colectivamente como lectinas. Consultar J. Lu et al., *Biochim. Biophys*. *Acta 1572*:387 400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol*. 21:547 578 (2003); Teh et al., *Immunology 101*:225 232 (2000)). Consultar también J. Luet et al, *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al, *Annu Rev Immunol* 21:547-578 (2003); Teh et al, *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al, *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda et al. demostraron por primera vez que, al igual que C1q, MBL podía activar el sistema del complemento al unirse a los eritrocitos recubiertos de manano de levadura de manera dependiente de C4 (Ikeda et al., *J. Biol*. *Química. 262*:7451 7454, (1987)). MBL, un miembro de la familia de la proteína de recolección, es una lectina dependiente del calcio que une los carbohidratos con grupos de hidróxidos-3 y 4 orientados en el plano ecuatorial del anillo de la piranosa. Los ligandos prominentes para MBL son por lo tanto D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no se ajustan a este requisito estérico tienen una afinidad indetectable para MBL (Weis et al., *Nature* 360:127 134, (1992)). La interacción entre la MBL y los azúcares monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación típicamente en el rango milimolar de un solo dígito. MBL logra una unión estrecha y específica a los ligandos de glicano por medio de la avidez, es decir, interactuando simultáneamente con múltiples residuos de monosacáridos ubicados

muy cerca uno del otro (Lee et al., *Archiv. Bioquímica. Biophys*. 299:129 136, (1992)). MBL reconoce los patrones de carbohidratos que comúnmente decoran microorganismos como bacterias, levaduras, parásitos y ciertos virus. En contraste, MBL no reconoce la D-galactosa y el ácido siálico, los penúltimos y últimos azúcares que suelen decorar los glicoconjugados complejos "maduros" presentes en el plasma de mamíferos y en las glicoproteínas de la superficie celular. Esta especificidad de unión está pensada para promover el reconocimiento de superficies "extrañas" y ayudar a proteger contra la "autoactivación". Sin embargo, MBL se une con alta afinidad a grupos de glicanos "precursores" de alta manosa en glicoproteínas ligadas a N y glicolípidos secuestrados en el retículo endoplásmico y Golgi de células de mamíferos (Maynard et al., *J. Biol. Química. 257*:3788-3794, (1982)). Además, se ha demostrado que la MBL puede unir los polinucleótidos, el ADN y el ARN, que pueden estar expuestos en células necróticas y apoptóticas (Palaniyar et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1010:467-470 (2003); Nakamura et al., *J. Leuk. Biol*. 86:737-748 (2009)). Por lo tanto, las células dañadas son objetivos potenciales para la activación de la vía de la lectina a través de la unión de MBL.

Las ficolinas poseen un tipo diferente de dominio de lectina que el MBL, llamado dominio de tipo fibrinógeno. Las ficolinas unen los residuos de azúcar de manera independiente del Ca++. En los humanos, se han identificado tres tipos de ficolinas (L ficolina, M ficolina y H ficolina). Las dos ficolinas séricas, L ficolina y H ficolina, tienen en común una especificidad para N acetil-D glucosamina; sin embargo, H ficolina también une N acetil-D galactosamina. La diferencia en la especificidad del azúcar de L ficolina, H ficolina, CL-11 y MBL significa que las diferentes lectinas pueden ser complementarias y dirigirse a glicoconjugados diferentes, aunque superpuestos. Este concepto está respaldado por el reciente informe de que, de las lectinas conocidas en la vía de la lectina, sólo la L ficolina se une específicamente al ácido lipotéico, un glicoconjugado de la pared celular que se encuentra en todas las bacterias Gram positivas (Lynch et al., *J. Immunol. 172*:1198 1202, (2004)). Además de las variedades de azúcar acetiladas, las ficolinas también pueden unirse a los aminoácidos acetilados y polipéptidos (Thomsen et al., *Mol. Immunol*. 48(4):369-81 (2011)). Las colectas (es decir, MBL) y las ficolinas no tienen similitudes significativas en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones de dominio similares y, como C1q, se reúnen en estructuras oligoméricas, que maximizan la posibilidad de unión multicéntrica.

Las concentraciones séricas de MBL son altamente variables en poblaciones sanas y esto es controlado genéticamente por polimorfismos/mutaciones tanto en la región promotora como en la codificante del gen MBL. Como proteína en fase aguda, la expresión de MBL se aumenta aún más durante la inflamación. La L ficolina está

presente en el suero en concentraciones similares a las de MBL. Por lo tanto, la rama de L ficolina de la vía de la lectina es potencialmente comparable a la fuerza del brazo MBL. Las MBL y las ficolinas también pueden funcionar como opsoninas, lo que permite que los fagocitos se dirijan a superficies decoradas con MBL y ficolina (consultar Jack et al., *J Leukoc Biol*., 77(3):328-36 (2004), Matsushita y Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol*, 174(1):418-25(2005). Esta opsonización requiere la interacción de estas proteínas con los receptores de fagocitos (Kuhlman et al., *J. Exp. Med. 169*:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Química. 271*:2448 54, (1996)), cuya identidad no ha sido establecida.

El MBL humano forma una interacción específica y de alta afinidad a través de su dominio de tipo colágeno con C1r/Cls únicas como las proteasas serinas, denominadas proteasas serinas asociadas al MBL (MASPs). Hasta la fecha, se han descrito tres MASPs. En primer lugar, se identificó y caracterizó una sola enzima "MASP" como la enzima responsable del inicio de la cascada del complemento (es decir, la escisión de C2 y C4) (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol. 150*:571 578, (1993)). Posteriormente se determinó que la actividad del MASP era, de hecho, una mezcla de dos proteasas: MASP 1 y MASP 2 (Thiel et al., *Nature 386*:506 510, (1997)). Sin embargo, se demostró que el complejo MBL MASP 2 por sí solo es suficiente para la activación del complemento (Vorup Jensen et al., J*. Immunol. 165*:2093 2100, (2000)). Además, sólo MASP 2 escindió C2 y C4 a altas tasas (Ambrus et al., *J. Immunol. 170*:1374 1382, (2003)). Por lo tanto, MASP 2 es la proteasa responsable de activar C4 y C2 para generar la convertasa C3, C4b2a. Esta es una diferencia significativa con respecto al complejo C1 de la vía clásica, donde la acción coordinada de dos proteasas serinas específicas (C1r y C1s) conduce a la activación del sistema del complemento. Además, se ha aislado una nueva tercera proteasa, MASP 3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity 15*:127 35, 2001). MASP 1 y MASP 3 son productos empalmados alternativamente del mismo gen.

Los MASPs comparten organizaciones de dominio idénticas a las de Clr y Cls, los componentes enzimáticos del complejo Cl (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans. 28*:545, (2000)). Estos dominios incluyen un dominio N terminal Clr/Cls/ erizo de mar VEGF/proteína morfogénica ósea (CUB), un factor de crecimiento epidérmico como dominio, un segundo dominio CUB, un tándem de dominios de proteínas de control de complemento y un dominio de proteasa serina. Al igual que en las proteasas C1, la activación de MASP 2 ocurre a través de la escisión de un enlace Arg I1e adyacente al dominio de la proteasa serina, que divide la enzima en cadenas A y B unidas por disulfuro, esta última formada por el dominio de la proteasa serina.

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

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

Se cree ampliamente que la vía de la lectina tiene un papel importante en la defensa del huésped contra la infección en el huésped ingenuo. Las pruebas sólidas de la participación del MBL en la defensa del huésped provienen del análisis de pacientes con niveles séricos disminuidos de MBL funcional (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta 1572*:401 413, (2002)). Estos pacientes muestran susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Estos síntomas suelen ser evidentes en los primeros años de vida, durante una aparente ventana de vulnerabilidad a medida que disminuye el título de anticuerpos derivados de la maternidad, pero antes de que se desarrolle un repertorio completo de respuestas de anticuerpos. Este síndrome a menudo resulta de mutaciones en varios sitios en la porción colágena de MBL, que interfieren con la formación adecuada de oligómeros MBL. Sin embargo, dado que la MBL puede funcionar como una opsonina independiente del complemento, no se sabe hasta qué punto la mayor susceptibilidad a la infección se debe a una activación deficiente del complemento.

A diferencia de las vías clásicas y de la lectina, no se ha encontrado previamente ningún iniciador de la vía alternativa que cumpla las funciones de reconocimiento que la C1q y las lectinas desempeñan en las otras dos vías. Actualmente se acepta ampliamente que la vía alternativa sufre espontáneamente un bajo nivel de activación de la rotación, que puede ser fácilmente amplificada en superficies extrañas u otras superficies anormales (bacterias, levaduras, células infectadas por virus o tejido dañado) que carecen de los elementos moleculares adecuados que mantienen a raya la activación espontánea del complemento. Existen

cuatro proteínas plasmáticas directamente implicadas en la activación de la vía alternativa: C3, factores B y D, y properdina.

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

Estudios recientes han demostrado que MASP-1 y MASP-3 convierten el factor de activación de la vía alternativa de la enzima D de su forma de zimógeno a su forma enzimáticamente activa (consultar Takahashi M. et al., *J Exp Med* 207(1):29-37 (2010); Iwaki et al., *J. Immunol*. 187:3751-58 (2011)). La importancia fisiológica de este proceso queda subrayada por la ausencia de actividad funcional de la vía alternativa en el plasma de ratones con deficiencia de MASP-1/3. La generación proteolítica de C3b a partir de C3 nativo es necesaria para que la vía alternativa funcione. Dado que convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como subunidad esencial, la pregunta sobre el origen de la primera C3b a través de la vía alternativa ha presentado un problema desconcertante y ha estimulado una investigación considerable.

C3 pertenece a una familia de proteínas (junto con C4 y α 2 macroglobulina) que contienen una rara modificación postraslacional conocida como enlace tioéster.

El grupo tioéster está compuesto por una glutamina cuyo grupo terminal carbonilo forma un enlace tioéster covalente con el grupo sulfhidrilo de una cisteína a tres aminoácidos de distancia. Este enlace es inestable y el glutamil tioéster electrofílico puede reaccionar con fracciones nucleófilas como el hidroxilo o grupos amino y formar así un enlace covalente con otras moléculas. El enlace tioéster es razonablemente estable cuando se secuestra dentro de una bolsa hidrofóbica de C3 intacta. Sin embargo, la escisión proteolítica de C3 a C3a y C3b da lugar a la exposición del enlace tioéster altamente reactivo en C3b y, tras el ataque nucleofílico por parte de variedades adyacentes que comprenden grupos hidroxilo o aminoácidos, C3b se une covalentemente a un objetivo. Además de su bien documentado papel en la fijación covalente de C3b para complementar los objetivos, se cree que el tioéster C3 también tiene un papel fundamental en el desencadenamiento de la vía alternativa. De acuerdo con la ampliamente aceptada "teoría del tick over", la vía alternativa se inicia con la generación de una convertasa de fase fluida, iC3Bb, que se forma a partir de C3 con tioéster hidrolizado (iC3; C3(H_2O)) y factor B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Inmunopatología. 7*:143 162, (1984)). El C3b como el C3(H2O) es generado a partir del C3 nativo por una lenta hidrólisis espontánea del tioester interno en la proteína (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med. 154*:856 867, 1981). A través de la actividad de la convertasa C3 (H2O)Bb, las moléculas C3b se depositan en la superficie del objetivo, iniciando así la vía alternativa.

Antes del descubrimiento instantáneo descrito aquí, se sabía muy poco sobre los iniciadores de la activación de la vía alternativa. Se creía que los activadores incluían paredes celulares de levadura (zimosan), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas. La única característica común de estos activadores es la presencia de hidratos de carbono, pero la complejidad y variedad de las estructuras de los hidratos de carbono ha hecho difícil establecer los determinantes moleculares compartidos que se reconocen. Se ha aceptado ampliamente que la activación de la vía alternativa se controla a través del buen equilibrio entre los componentes reguladores inhibidores de esta vía, como el factor H, factor I, DAF y CR1, y properdina, el último de los cuales es el único regulador positivo de la vía alternativa (consultar Schwaeble W.J. y Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999)).

Además del mecanismo de activación aparentemente no regulado descrito anteriormente, la vía alternativa también puede proporcionar un potente bucle de amplificación para la convertasa C3 de via de lectina/clásica (C4b2a), ya que cualquier C3b generado puede participar con el factor B en la formación de convertasa C3 de la vía alternativa adicional (C3bBb). La convertasa C3 de vía

alternativa es estabilizada por la unión de properdina. Properdina amplía la vida útil de la vía alternativa de convertasa C3 de seis a diez veces. La adición de C3b a la convertasa C3 de vía alternativa conduce a la formación de convertasa C5 de vía alternativa.

Se ha pensado que las tres vías (es decir, la clásica, la lectina y la alternativa) convergen en la C5, que se escinde para formar productos con múltiples efectos proinflamatorios. La vía de convergencia se ha denominado vía de complemento terminal. La C5a es la anafilatoxina más potente, que induce alteraciones en el tono muscular liso y vascular, así como en la permeabilidad vascular. También es una potente quimiotaxina y activadora tanto de neutrófilos como de monocitos. La activación celular mediada por C5a puede amplificar significativamente las respuestas inflamatorias al inducir la liberación de múltiples mediadores inflamatorios adicionales, incluyendo citoquinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos de ácido araquidónico y especies reactivas de oxígeno. La escisión de C5 conduce a la formación de C5b 9, también conocido como el complejo de ataque por membrana (MAC). En la actualidad existen pruebas sólidas de que la deposición sublítica de MAC puede desempeñar un papel importante en la inflamación, además de su función como complejo formador de poros líticos.

Además de su papel esencial en la defensa inmunológica, el sistema del complemento contribuye al daño tisular en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar inhibidores del complemento terapéuticamente efectivos para prevenir estos efectos adversos.

RESUMEN

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio de la serina proteasa de MASP-3 humano (residuos de aminoácidos 450 a 728 de la SEQ ID NO: 2) con alta afinidad (que tiene un K_D de menos de 500 pM), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la activación del complemento de la vía alternativa. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión de antígenos se caracterizan por al menos una o más de las siguientes propiedades: (a) inhibe la maduración del pro-Factor D; (b) no se une al MASP-1 humano (SEQ ID NO:8); (c) inhibe la vía alternativa en una proporción molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2.5:1 (objetivo MASP-3 a mAb) en un sujeto mamífero (d) no inhibe la vía clásica (e) inhibe la hemólisis y/u opsonización; (f) inhibe la división específica del sustrato de proteasa serina MASP-3; (g) reduce la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición de la superficie de C3b; (h) reduce la deposición del Factor B y / o Bb en

una superficie activa; (i) reduce los niveles de reposo (en circulación, y sin la adición experimental de una superficie activadora) del Factor D activo en relación con el pro-Factor D; (j) reduce el nivel del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; (k) reduce la producción de niveles de reposo y de niveles inducidos por la superficie de la fase fluida Ba, Bb, C3b o C3a; y/o (l) reduce la deposición del factor P. En algunos realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1 o 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítope localizado dentro de la proteasa de serina de MASP-3 humano, en el que dicho epítopo está localizado dentro de por lo menos uno o más de: VLRSQRRDTTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO:11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO:12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO:13), VSNYVDWVWWE (SEQ ID NO:14) y/o VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:15). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un epítopo dentro de al menos uno de: ECGQPSRSLPSLPSLV (SEQ ID NO:16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO:17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID NO:18); EHVTVYLGLGLH (SEQ ID NO:19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO:20); APHMLGL (SEQ ID NO:21); SDVLQYVYVKLP (SEQ ID NO:22); y/o, AFVVIFDDLSQRWRW (SEQ ID NO:23).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que une a MASP-3 que comprende: a) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:209 (XXDIN, donde X en la posición 1 es S o T y donde X en la posición 2 es N o D); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, donde X en la posición 7 es G o D; X en la posición 8 es S, T o R; X en la posición 9 es I o T; X en la posición 13 es E o D; X en la posición 14 es K o E; y X en la posición 16 es T o K); y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:211 (XEDXY, donde X en la posición 1 es L o V, y donde X en la posición 4 es T o S); y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, donde X en la posición 8 es N, I, Q o A; donde X en la posición 9 es S o T; y donde X en la posición 17 es A o S); un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:144 (WASTRES) y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:146 (KQSYNLYT).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que une a MASP-3 que comprende: a) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:213 (SYGXX, donde X en la posición 4 es M o I y donde X en la posición 5 es S o T); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:74; y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:214 (GGXAXDY, donde X en la posición 3 es E o D y

donde X en la posición 5 es M o L); y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:215 (KSSQSLLDSXXKTYLX , donde X en la posición 10 es D, E o A; donde X en la posición 11 es G o A; y donde X en la posición 16 es N o S); un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:155; y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:216 (WQGTHFPXT, donde X en la posición 8 es W o Y).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que une a MASP-3 que comprende: a) una región de variables de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:84 (GKWIE); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:86 (EILPGTGTGSTNYNEKFKG) o SEQ ID NO:275 (EILPGTGTGSTNYAQKFQQG); y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:88 (SEDV); y b) una región de variables de cadena ligera que incluye un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); o SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:144 (WASTRES); y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:161 (KQSYNIPT)

En otro aspecto, la presente invención proporciona un un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que une a MASP-3 que comprende: a) una región de variables de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:91 (GYWIE); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:93 (EMLPGSGGSGSTHYNEKFKG), y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:95 (SIDY); y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:165 (KVSNRFS) y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:167 (SQSTHVPPT).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que une a MASP-3 que comprende:

a) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:109 (RVHFAIRDTNYWMQ), un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:110 (AIYPGNGDDTSYNQKFKFKG), un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:112 (GSHYFDY); y una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:182 (RASQSIGTSIH), un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:184 (YASESIS) y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:186 (QQSNSWPYT); o

b) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:125 (DYYMN), un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:127 (DVNPNNDGTTTYNQKFKFKG), un HC-CDR3 establecido como SEQ ID

NO:129 (CPFYYLGKGTHFDY); y una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:196 (RASQDISNFLN), un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:198 (YTSRLHS) y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:200 (QQGFTLPWT); o

c) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:137, un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:138, un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:140; y una región de variables de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:206, un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:207 y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:208: o

d) una región variable de la cadena pesada que comprenda un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:98, un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:99, un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:101; y una región de variables de la cadena ligera que comprenda un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:169, un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:171 y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:173; o

e) una región variable de la cadena pesada que comprenda un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:103, un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:105, un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:107; y una región de variables de cadena ligera que comprenda un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:176, un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:178 y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:193: o

f) una región variable de la cadena pesada que comprenda un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:114, un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:116, un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:118; y una región de variables de cadena ligera que comprenda un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:188, un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:178 y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:190; o

g) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:114, un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:121, un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:123; y una región de variables de cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:191, un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:178 y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:193.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la activación de complemento de vía alternativa en un mamífero, el método que comprende la administración a un sujeto mamífero en necesidad del mismo de una cantidad de una composición que comprende un anticuerpo inhibidor MASP-3 de alta afinidad o un fragmento de unión de antígenos del mismo suficiente para inhibir la

activación de la vía alternativa de complemento de vía en el mamífero. En una realización del método, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, se une al MASP-3 con una afinidad de menos de 500 pM. En una realización del método, como resultado de la administración de la composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, uno o más de los siguientes elementos están presentes en el sujeto mamífero: (a) inhibición de la maduración del factor D; (b) inhibición de la vía alternativa cuando se administra al sujeto en una proporción molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2.5:1 (objetivo MASP-3 a mAb); (c) no se inhibe la vía clásica; (d) inhibición de la hemólisis y/u opsonización; (e) reducción de la hemólisis o reducción de la escisión de C3 y de la deposición de la superficie de C3b; (f) reducción de la deposición del Factor B y Bb en una superficie activadora; g) una reducción de los niveles de reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie activadora) del Factor D activo en relación con el pro-Factor D; h) una reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; y/o i) una reducción de la producción de niveles de reposo y de niveles inducidos por la superficie de las fases líquidas Ba, Bb, C3b o C3a. En una realización del método, la composición comprende un anticuerpo inhibidor MASP-3 que inhibe la vía alternativa en una proporción molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2,5:1 (objetivo MASP-3 a mAb).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de inhibición de la activación del complemento dependiente de MASP-3 en un sujeto que sufre de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica, asma, enfermedad de depósitos densos, glomerulonefritis paucio-inmune necrosante semilunar, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica o enfermedad de Behcet. El método incluye el paso de administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un agente inhibidor MASP-3 de alta afinidad eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente del MASP-3. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración al sujeto de una composición que comprende un agente inhibidor del MASP-2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para fabricar un medicamento para uso en la inhibición de los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-3 en sujetos vivos que lo necesiten, que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-3 en un portador farmacéutico. En algunas realizaciones, el agente inhibidor del MASP-3 es un anticuerpo inhibidor del MASP-3 de alta afinidad. En algunas realizaciones, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende

fabricar un medicamento para su uso en la inhibición de los efectos de la activación del complemento dependiente de MASP-3 en un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica, asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonfritis crescéntrica pauci-inmune necrotizante, lesión traumática cerebral, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica o enfermedad de Behcet. En algunas realizaciones, el método comprende además combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 en o con el medicamento que comprende el inhibidor de MASP-3.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador fisiológicamente aceptable y un anticuerpo monoclonal MASP-3 inhibidor de alta afinidad o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa. En una realización, dicha alta afinidad MASP-3 anticuerpo o o fragmento de unión de antígeno del mismo comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende (i) SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que incluye SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y iii) VHCDR3, que incluye SEQ ID NO:88; y b) una región variable de la cadena ligera que comprende i) VLCDR1, que incluye SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259; ii) VLCDR2, que incluye SEQ ID NO:144, y iii) VLCDR3, que incluye SEQ ID NO:161.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre de, o está en riesgo de desarrollar hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), que comprende la administración al sujeto de una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión de antígenos del mismo que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de PNH en el sujeto. En una realización, anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende: a) una región variable de la cadena pesada que comprende: a) una región variable de la cadena pesada que comprende: i) VHCDR1 que incluye: SEQ ID NO:84, ii) VHCDR2 que incluye: SEQ ID NO:86 o SEQ ID

NO:275 y iii) VHCDR3, que incluye SEQ ID NO:88; y b) una región variable de la cadena ligera que comprende i) VLCDR1, que incluye SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259; ii) VLCDR2, que incluye SEQ ID NO:144, y iii) VLCDR3, que incluye SEQ ID NO:161. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto que sufre

de PNH. En algunas realizaciones, en las que el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar PNH presenta uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en (i) niveles de hemoglobina por debajo de lo normal, (ii) niveles de plaquetas por debajo de lo normal; (iii) niveles de reticulocitos por encima de lo normal, y (iv) niveles de bilirrubina por encima de lo normal. En algunos casos, la composición farmacéutica se administra sistémicamente (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial o como inhalante) a un sujeto que sufre o corre el riesgo de desarrollar PNH. En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de padecer PNH ha sido sometido previamente, o está siendo sometido actualmente a un tratamiento con un inhibidor terminal del complemento que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración al sujeto de un inhibidor terminal del complemento que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el inhibidor terminal del complemento es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor terminal del complemento es eculizumab.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre de, o en riesgo de desarrollar artritis (artritis inflamatoria y no inflamatoria) que consiste en administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de artritis en el sujeto. En una realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que comprende SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y (iii) VHCDR3 que comprende SEQ ID NO:88; y b) una región variable de la cadena ligera que comprende: i) VLCDR1, que comprende: SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259; ii) VLCDR2, que comprende: SEQ ID NO:144, y iii) VLCDR3, que comprende: SEQ ID NO:161. En algunas realizaciones, el sujeto sufre de artritis seleccionada por el grupo compuesto por osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Behcet, artritis relacionada con infecciones y artritis psoriásica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra sistémicamente (es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial o como inhalante). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra localmente a una articulación.

Como se describe en el presente documento, las diversas realizaciones de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad, opcionalmente en combinación

con las diversas realizaciones de los agentes inhibidores de MASP-2, pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Como se describe en el presente documento, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención descrita en este documento serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada y figuras. Todas las patentes de EE. UU., las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU., las solicitudes de patente de EE. UU., las patentes extranjeras, las solicitudes de patente extranjera y las publicaciones de no patente a las que se hace referencia en especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad, como si se hubieran incorporado individualmente.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas concomitantes de esta invención se apreciarán más fácilmente a medida que se entiendan mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se toma junto con las figuras adjuntas, en donde:

La FIGURA 1 ilustra una nueva comprensión de la lectina y vías alternativas;

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático adaptado de Schwaeble et al., *Immunobiol* 205: 455-466 (2002), modificado por Yongqing et al., *BBA* 1824: 253 (2012), que ilustra los dominios de las proteínas MASP-1, MASP-3 y MAp44 y los exones que los codifican;

La FIGURA 3 representa la secuencia de aminoácidos de MASP-3 humana (SEQ ID NO: 2) con la secuencia líder mostrada en subrayado;

La FIGURA 4 muestra una alineación de la proteína MASP-3 de longitud completa de múltiples especies;

La FIGURA 5 muestra una alineación del dominio SP de la proteína MASP-3 de múltiples especies;

La FIGURA 6 es un diagrama de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de 2.6×10^7 ufc de *N. meningitidis* serogrupo A Z2491, lo que demuestra que los ratones deficientes en MASP-2 están protegidos a partir de la mortalidad inducida por *N. meningitidis* , como se describe en el Ejemplo 1;

La FIGURA 7 es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de 6×10^6 ufc de la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B, lo que demuestra que los ratones deficientes en MASP-2

están protegidos a partir de la mortalidad inducida por *N. meningitidis* , como se describe en el Ejemplo 1;

La FIGURA 8 ilustra gráficamente el log ufc/mL de la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B por mL de sangre recuperada de ratones MASP-2 KO y WT en diferentes momentos después de una infección intraperitoneal con $6x10^6$ ufc la cepa MC58N de *N. meningitidis* serogrupo B (n = 3 en diferentes momentos para ambos grupos de ratones), lo que demuestra que aunque los ratones MASP-2 KO se infectaron con la misma dosis de la cepa MC58N de *N. meningitidis* serogrupo B como los ratones WT, los ratones MASP-2 KO tienen un mejor aclaramiento de bacteriemia en comparación con WT, como se describe en el Ejemplo 1;

La FIGURA 9 ilustra gráficamente el puntaje promedio de enfermedad de los ratones MASP-2 KO y WT a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la infección con $6x10^6$ ufc de la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B, lo que demuestra que los ratones deficientes en MASP-2 mostraron mostraron puntuaciones de enfermedad mucho más bajas a las 6 horas, 12 horas y 24 horas después de la infección, en comparación con los ratones WT, como se describe en el Ejemplo 1;

La FIGURA 10 es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones después de la administración de una dosis infecciosa de $4x10^6$ cfu de la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B, seguida de la administración 3 horas después de la infección del anticuerpo inhibidor de MASP-2 (1 mg / kg) o del anticuerpo de isotipo de control, lo que demuestra que el anticuerpo MASP-2 es eficaz para tratar y mejorar la supervivencia en sujetos infectados con *N. meningitidis* , como se describe en el Ejemplo 2;

La FIGURA 11 ilustra gráficamente el log ufc / mL de recuentos viables de la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B recuperados en diferentes momentos en las muestras de sueros humanos que se muestran en la TABLA 6 tomadas en varios momentos después de la incubación con la cepa MC58 de *N. meningitidis* serogrupo B como se describe en el Ejemplo 3;

La FIGURA 12 ilustra gráficamente el log ufc / mL de recuentos viables de *N. meningitidis*, el serogrupo B-MC58 recuperado en diferentes momentos en las muestras de sueros humanos que se muestran en la TABLA 8, mostrando que la destrucción de *N. meningitidis* dependiente del complemento en suero humano al 20% (v / v) depende de MASP-3 y de MBL, como se describe en el Ejemplo 3;

La FIGURA 13 ilustra gráficamente el log ufc / mL de recuentos viables de *N. meningitidis* serogrupo B-MC58 recuperado en diferentes momentos en las muestras de sueros de ratón que se muestran en la TABLA 10, que muestra que el suero MASP-2 - / - ratón knockout (conocido como "MASP-2 - / -") tiene un mayor nivel de actividad bactericida para N. meningitidis que el suero del ratón WT, mientras que

en contraste, el suero MASP-1/3 - / - de ratón no tiene ninguna actividad bactericida, como se describe en el Ejemplo 3;

La FIGURA 14 ilustra gráficamente la cinética de la activación de C3 en condiciones específicas de la vía de lectina (1% de plasma) en sueros de ratones WT, C4 - / -, MASP-1/3 - / -, Factor B - / - y MASP-2 - / - como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 15 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por la vía alternativa (impulsada por AP) en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en condiciones "tradicionales" específicas de la vía alternativa (AP específica) (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) como una función de la concentración sérica en muestras de suero obtenidas de sujetos humanos deficientes en MASP-3, deficientes en C4 y deficientes en MBL, como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 16 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en condiciones "tradicionales" de AP específica (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) como una función del tiempo en muestras de suero humano del 10% obtenidas de sujetos humanos deficientes en MASP-3, deficientes en C4 y deficientes en MBL, como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 17A ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas con manano en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de ratones WT, deficientes en MASP-2 y deficientes en MASP-1/3 en condiciones “tradicionales” de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas que permiten que la vía de lectina y la vía alternativa (AP) funcionen (BBS / Mg ++ / Ca ++), como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 17B ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de ratones WT, MASP-2 deficientes y MASP-1/3 en condiciones tradicionales de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas que permiten que la vía de lectina y la vía alternativa funcionen (BBS / Mg ++ / Ca ++), como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 17C ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas con *S. pneumoniae* D39 en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de ratones WT, MASP-2 deficientes y MASP-1/3 en condiciones tradicionales de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas que permiten que la vía de lectina y la vía alternativa funcionen (BBS / Mg ++ / Ca ++), como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 18A ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b en sueros altamente diluidos realizados en placas de microtitulación recubiertas con manano en condiciones tradicionales de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas permitiendo que funcionen tanto la vía de lectina como la vía alternativa (BBS / Mg ++ / Ca ++), usando concentraciones séricas que van desde 0% hasta 1.25%, como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 18B ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b llevado a cabo en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en condiciones tradicionales de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas permitiendo que funcionen tanto la vía de lectina como la vía alternativa (BBS / Mg ++ / Ca ++), usando concentraciones séricas que van desde 0% hasta 1.25%, como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 18C ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b realizado en placas de microtitulación recubiertas con *S. pneumoniae* D39 en condiciones tradicionales de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) o en condiciones fisiológicas permitiendo que funcionen tanto la vía de lectina como la vía alternativa (BBS / Mg ++ / Ca ++), usando concentraciones séricas que van desde 0% hasta 1.25%, como se describe en el Ejemplo 4;

La FIGURA 19 ilustra gráficamente el nivel de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry / C3 - / -) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca ++) en un rango de diluciones séricas en suero de MASP-3 - / -, suero humano normal inactivado por calor (HI NHS), MBL - / -, NHS + anticuerpo monoclonal MASP-2 y control de NHS, como se describe en el Ejemplo 5;

La FIGURA 20 ilustra gráficamente el nivel de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry / C3 - / -) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca ++) en un rango de concentración sérica en suero de MASP-3 - / -, NHS inactivado por calor (MBS), MBL - / -, NHS + anticuerpo monoclonal MASP-2 y control de NHS, como se describe en el Ejemplo 5;

La FIGURA 21 ilustra gráficamente el nivel de hemólisis (medido por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón WT lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos por suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca ++) en un rango de concentraciones séricas en suero de 3MC (MASP-3 - / -), NHS inactivado por calor,

MBL - / -, NHS + anticuerpo monoclonal MASP-2 y control de NHS, como se describe en el Ejemplo 5;

La FIGURA 22 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (CD55 / 59 - / -) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos por suero humano en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca ++) en un rango de concentraciones séricas en suero de NHS inactivado por calor, MBL - / -, NHS + anticuerpo monoclonal MASP-2 y control de NHS, como se describe en el Ejemplo 5;

La FIGURA 23 ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos de manano por MASP-1/3 - / - suero de ratón y de suero de ratón WT de control en condiciones fisiológicas (es decir, en presencia de Ca ++) en un rango de concentraciones séricas, como se describe en el Ejemplo 6;

La FIGURA 24A es un histograma de FACS de unión de antígeno / anticuerpo MASP-3 para el clon M3J5, como se describe en el Ejemplo 7;

La FIGURA 24B es un histograma de FACS de unión de antígeno / anticuerpo MASP-3 para el clon M3M1, como se describe en el Ejemplo 7;

La FIGURA 25 ilustra gráficamente una curva de unión de saturación del clon M3J5 (Clon 5) para el antígeno MASP-3, como se describe en el Ejemplo 7;

La FIGURA 26A es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VH de DT40 de pollo, en donde los puntos representan la identidad del aminoácido con la secuencia de DT40 y los guiones indican espacios introducidos para maximizar la alineación, como se describe en Ejemplo 7;

La FIGURA 26B es una alineación de secuencia de aminoácidos de las regiones VL de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VL de DT40 de pollo, en donde los puntos representan la identidad de aminoácidos con la secuencia de DT40 y los guiones indican espacios introducidos para maximizar la alineación, como se describe en Ejemplo 7;

La FIGURA 27 es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibidora del anticuerpo monoclonal (mAb) 1E10 en la Pantalla del Sistema del Complementario de Wieslab, MBL Pathway en comparación con el suero positivo proporcionado con el kit de ensayo, así como un anticuerpo de control de isotipo, que demuestra que mAb1E10 inhibe parcialmente la activación dependiente de LEA-2, (mediante la inhibición de la activación dependiente de MASP-1 de MASP-2), mientras que el anticuerpo de control de isotipo no lo hace, como se describe en el Ejemplo 7;

La FIGURA 28A proporciona los resultados del análisis de citometría de flujo para la deposición de C3b en *Staphylococcus aureus* eliminado con calor, lo que demuestra que en suero humano normal en presencia de EDTA, que se sabe que inactiva la lectina y vías alternativas, no se observó deposición de C3b (panel 1), en suero humano normal tratado con Mg ++ / EGTA, se observa una deposición de C3b impulsada por la vía alternativa (panel 2), y como se muestra en el panel 3, 4 y 5, en suero con factor B agotado, factor D agotado y properdina (factor P) agotado , respectivamente, no se observa una deposición de C3b impulsada por una vía alternativa, como se describe en el Ejemplo 8;

La FIGURA 28B proporciona los resultados del análisis de citometría de flujo para la deposición de C3b en *S. aureus* eliminado por calor, lo que demuestra que, como en el suero normal tratado con EDTA (panel 1), la deposición de C3b impulsada por AP está ausente en el suero 3MC en presencia de Mg ++ / EGTA (panel 3), mientras que los paneles 4 y 5 muestran que tanto el rMASP-3 activo (panel 4) como el rMASP-3 activo (CCP1-CCP2-SP) (panel 5) restauran la deposición de C3b impulsada por AP en suero 3MC a los niveles observados en el suero normal tratado con Mg ++ / EGTA (panel 2), ni rMASP-3 ni el rMASP-3 inactivo (S679A) (panel 6) ni rMASP-1 de tipo salvaje (panel 7) pueden restaurar la deposición de C3b impulsada por AP en suero 3MC, como se describe en el Ejemplo 8;

La FIGURA 29 muestra los resultados de un análisis por Western blot para determinar la escisión del factor B en respuesta a *S. aureus* en suero 3MC en presencia o ausencia de rMASP-3, demostrando que el suero humano normal en presencia de EDTA (control negativo, carril 1) demuestra una escisión muy pequeña del Factor B en relación con el suero humano normal en presencia de Mg ++ / EGTA, que se muestra en el carril 2 (control positivo), como se muestra en en carril 3., el suero de 3MC demuestra una escisión muy pequeña del Factor B en presencia de Mg ++ / EGTA. Sin embargo, como se muestra en el carril 4, la escisión del Factor B se restaura mediante la adición y preincubación de la proteína MASP-3 recombinante de longitud completa al suero 3MC, como se describe en el Ejemplo 8;

La FIGURA 30 muestra la tinción de Coomassie de un gel proteico en el que se analiza la escisión del Factor B, lo que demuestra que la escisión del Factor B es más óptima en presencia de C3, MASP-3 y pro-factor D (carril 1), y como se muestra en los carriles 4 y 5, ya sea MASP-3 o pro-factor D solos pueden mediar la escisión del Factor B, siempre que C3 esté presente, como se describe en el Ejemplo 8;

La FIGURA 31 ilustra gráficamente las intensidades fluorescentes medias (MFI) de la tinción con C3b de *S. aureus* obtenida de mAbD14 (que se une a MASP-3), mAb1A5 (anticuerpo de control negativo) y un anticuerpo de control de isotipo representado como una función de la concentración de mAb en suero 3MC en

presencia de rMASP-3, demostrando que mAbD14 inhibe la deposición de C3b dependiente de MASP-3 de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el Ejemplo 8;

La FIGURA 32 muestra el análisis por Western blot de la escisión del sustrato pro-factor D, en donde se compara con pro-factor D solo (carril 1) o el MASP-3 recombinante inactivo de longitud completa (S679A; carril 3) o MASP-1 (S646A; carril 4), MASP-3 recombinante de longitud natural (carril 2) y MASP-1 (carril 5) escinde el pro-factor D total o parcialmente para generar el factor D maduro, como se describe en el Ejemplo 9;

La FIGURA 33 es un análisis por Western blot que muestra la actividad inhibidora de los mAbs D14 de unión a MASP-3 (carril 2) y M3M1 (carril 3) en la escisión de pro-factor D dependiente de MASP-3 en comparación con una reacción de control que contiene solo MASP-3 y pro-factor D (sin mAb, carril 1), así como una reacción de control que contiene un mAb obtenido de la biblioteca DTLacO que se une a MASP-1, pero no a MASP-3 (carril 4), como se describe en el Ejemplo 9;

La FIGURA 34 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de sujetos deficientes en MASP-3-deficiente (3MC), C4 y MBL, demostrando que los sueros deficientes en MASP -3 del Paciente 2 y del Paciente 3 tienen actividad residual de AP a concentraciones séricas altas (concentraciones séricas de 25%, 12.5%, 6.25%), pero un AP_{50} significativamente más alto (es decir, 8.2% y 12.3% del suero necesario para lograr el 50% de la deposición máxima de C3), como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 35A ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en condiciones "tradicionales" de AP específico (es decir, BBS / EGTA / Mg ++ sin Ca ++) en función del tiempo en muestras de suero humano del 10% obtenidas de sujetos humanos deficientes en MASP-3, C4 y MBL, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 35B muestra un análisis por Western blot con plasma obtenido de paciente 3MC # 2 (MASP-3 (- / -), MASP-1 (+ / +)), paciente 3MC # 3 (MASP-3 (- / -), MASP- 1 (- / -)), y sueros de donantes normales (W), en los que se detectó pro-factor D humano (25,040 Da) y / o factor D maduro (24,405 Da) con un anticuerpo humano específico del factor D, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 35C ilustra gráficamente los resultados de los ensayos Weislab de vía clásica, lectina y alternativa con plasma obtenido del paciente 3MC #2, paciente 3MC #3 y suero humano normal, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 36 ilustra gráficamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido

por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un rango de concentraciones séricas en suero de dos sujetos humanos normales (NHS) y de dos pacientes 3MC (paciente 2 y paciente 3), medidos en ausencia de Ca ++, que demuestran que la deficiencia de MASP-3 reduce el porcentaje de lisis mediada por complemento de eritrocitos recubiertos con manano en comparación con el suero humano normal, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 37 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en función de la concentración de proteína MASP-3 recombinante de longitud completa agregada a las muestras de suero obtenidas del paciente 2 3MC humano (MASP-3 - / -) , demostrando que, en comparación con el control negativo inactivo de MASP-3 recombinante (MASP-3A; S679A), la proteína MASP-3 recombinante activa reconstituye la deposición de C3b impulsada por AP en placas recubiertas con zimosán de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 38 ilustra gráficamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un rango de concentraciones séricas en (1) suero humano normal (NHS); (2) suero de paciente 3MC; (3) suero de paciente 3MC más MASP-3 recombinante activo de longitud completa (20 µg / ml); y (4) suero humano inactivado por calor (HIS), medido en ausencia de Ca ++, lo que demuestra que el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo aumenta significativamente en el suero 3MC que contiene rMASP-3 en comparación con el porcentaje de lisis en el suero 3MC sin MASP-3 recombinante ($p = 0.0006$), como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 39 ilustra gráficamente el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo en suero humano al 7% del Paciente 2 3MC y del Paciente 3 3MC que contiene MASP-3 recombinante activo en un rango de concentración de 0 a 110 µg / ml (en BBS / Mg ++ / EGTA, demostrando que el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo aumenta con la cantidad de MASP-3 recombinante de una manera dependiente de la concentración, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 40 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por LEA-2 en placas ELISA recubiertas con manano en función de la concentración de suero humano diluido en tampón BBS, para suero de un sujeto humano normal (NHS), de dos pacientes 3MC (Paciente 2 y Paciente 3), de los padres del Paciente 3 y de un sujeto con deficiencia de MBL, como se describe en el Ejemplo 10;

La FIGURA 41 ilustra gráficamente un ejemplo representativo de un experimento de unión que se realizó con MASP-3 humano en el que el Fab M3-1

(también denominado 13B1) muestra una afinidad de unión aparente (EC_{50}) de aproximadamente 0.117 nM a la proteína humana como se describe en el Ejemplo 11;

La FIGURA 42 ilustra gráficamente un ejemplo representativo de un experimento de unión que se realizó con MASP-3 de ratón en el que el Fab M3-1 (también denominado 13B1) muestra una afinidad de unión aparente (EC_{50}) de aproximadamente 0.214 nM a la proteína de ratón como se describe en el Ejemplo 11;

La FIGURA 43 ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor Bb del complemento en partículas de zimosán (determinado por la detección citométrica medida en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de mAb M3-1 (también conocido como 13B1) en suero humano agotado de CFD, como se describe en el Ejemplo 11;

La FIGURA 44 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3 en partículas de zimosán en varios momentos después de una dosis única de mAb M3-1 (13B1) (10 mg / kg i.v.) en ratones de tipo salvaje, como se describe en el Ejemplo 11;

La FIGURA 45 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los glóbulos rojos (WT o Crry-) del donante durante un período de 14 días en ratones receptores de tipo salvaje tratados con mAb M3-1 (13B1) (10 mg / kg en los días -11, 04, - 1 y +6), ratones tratados con mAb BB5.1 o tratados con vehículo, como se describe en el Ejemplo 12;

La FIGURA 46 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los glóbulos rojos del donante (WT o Crry-) durante un período de 16 días en ratones receptores de tipo salvaje tratados con una dosis única de mAb M3-1 (13B1) (20 mg / kg en el día -6) o ratones tratados con vehículo, como se describe en el Ejemplo 12;

La FIGURA 47 ilustra gráficamente las puntuaciones clínicas de los ratones tratados con mAb M3-1 (13B1) (5 mg / kg o 20 mg / kg) o ratones tratados con vehículo durante un período de 14 días en un modelo de artritis inducida por colágeno-anticuerpo, como se describe en el Ejemplo 13;

La FIGURA 48 ilustra gráficamente el porcentaje de incidencia de artritis de los ratones tratados con mAb M3-1 (13B1) (5 mg / kg o 20 mg / kg) o ratones tratados con vehículo durante un período de 14 días en un modelo de artritis inducida por colágeno-anticuerpo, como se describe en el Ejemplo 13;

La FIGURA 49A muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones VH de mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad (≤500 pM), como se describe en el Ejemplo 15;

La FIGURA 49B muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones VL de mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad (≤500 pM), como se describe en el Ejemplo 15;

La FIGURA 50A es un dendrograma de las regiones VH de mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad, como se describe en el Ejemplo 15;

La FIGURA 50B es un dendrograma de las regiones VL de mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad, como se describe en el Ejemplo 15;

La FIGURA 51A ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos recombinantes purificados representativos muestran una avidez de unión aparente de menos de 500 pM (por ejemplo, de 240 pM a 23 pM) a la proteína MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 51B ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos recombinantes purificados representativos muestran una avidez de unión aparente de menos de 500 pM (por ejemplo, de 91 pM a 58 pM) a la proteína MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 51C ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que se muestra que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad recombinantes purificados representativos para ser selectivos para la unión a MASP-3 y no se unen a MASP-1 humana, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 51D ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que se muestra que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad recombinantes purificados representativos para ser selectivos para la unión a MASP-3 y no se unen a MASP-2 humana, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 52 ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos recombinantes purificados representativos también muestran una alta avidez de unión a la proteína MASP-3 de ratón, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 53 ilustra gráficamente los resultados de un experimento que mide la capacidad de los anticuerpos MASP-3 representativos de alta afinidad para inhibir la escisión del tripéptido fluorogénico, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 54 muestra un análisis por Western blot que demuestra la capacidad de inhibidores mAbs de MASP-3 de alta afinidad representativos para bloquear la escisión mediada por MASP-3 recombinante de pro-factor D a factor D en un ensayo *in vitro*, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 55A ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor de complemento Bb en partículas de zimosán (determinada por la detección de citometría de flujo medida en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de mAbs 1F3, 1G4, 2D7 y 4B6 de MASP-3 de alta afinidad en suero humano agotado de factor D, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 55B ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor Bb del complemento en partículas de zimosán (determinada por la detección de citometría de flujo medida en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de mAbs 4D5, 10D12 y 13B1 de alta afinidad en suero humano agotado en factor D, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 56A ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo en presencia de concentraciones variables de mAb de 1A10, 1F3, 4B6, 4D5 y 2F2 de MASP-3 de alta afinidad como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 56B ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo en presencia de concentraciones variables de mAb de 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 y 2F5 de MASP-3 de alta afinidad como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 57 muestra un análisis para Western blot que analiza el nivel de pro-Factor D) y Factor D en suero de paciente 3MC (Paciente B) en presencia de MASP-3 recombinante activo (rMASP-3), rMASP-3 inactivo y rMASP activo 3 más el mAb 4D5 de MASP-3 de alta afinidad, como se describe en el Ejemplo 16;

La FIGURA 58 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3 / C3b / iC3b sobre partículas de zimosán en diversos momentos después de una dosis única de mAbs M3-1 de MASP-3 de alta afinidad (13B1, 10 mg / kg) o 10D12 (10 mg / kg) en ratones de tipo salvaje, como se describe en el Ejemplo 17;

La FIGURA 59 muestra un análisis por Western blot que analiza el estado del fragmento del Factor Ba del Factor B en ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3 (10 mg / kg) de alta afinidad o ratones tratados con control de vehículo, como se describe en el Ejemplo 17;

La FIGURA 60 ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la hemólisis en suero al 20% de ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3 (10 mg / kg o 25 mg / kg) de alta afinidad, como se describe en el Ejemplo 17;

La FIGURA 61A ilustra gráficamente los resultados del análisis de unión competitiva para identificar mAbs de MASP-3 de alta afinidad que bloquean la interacción entre el mAb 4D5 de MASP-3 de alta afinidad y MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 61B ilustra gráficamente los resultados del análisis de unión competitiva para identificar mAbs de MASP-3 de alta afinidad que bloquean la

interacción entre el mAb 10D12 de MASP-3 de alta afinidad y MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 61C ilustra gráficamente los resultados del análisis de unión competitiva para identificar mAbs de MASP-3 de alta afinidad que bloquean la interacción entre el mAb 13B1 de MASP-3 de alta afinidad y MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 61D ilustra gráficamente los resultados del análisis de unión competitiva para identificar mAbs de MASP-3 de alta afinidad que bloquean la interacción entre el mAb 1F3 de MASP-3 de alta afinidad y MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 61E ilustra gráficamente los resultados del análisis de unión competitiva para identificar mAbs de MASP-3 de alta afinidad que bloquean la interacción entre el mAb 1G4 de MASP-3 de alta afinidad y MASP-3 humana, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 62 proporciona un diagrama esquemático que muestra las regiones de contacto en MASP-3 humano por los mAbs de MASP-3 de alta afinidad, según lo determinado por el análisis de Pepscan, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 63A muestra las regiones de contacto entre los mAbs 1F3, 4D5 y 1A10 de MASP-3 humano y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 498-509 (SEQ ID NO: 9), residuos de aminoácidos 544-558 (SEQ ID NO: 11), los residuos de aminoácidos 639 a 649 (SEQ ID NO: 13) y los residuos de aminoácidos 704 a 713 (SEQ ID NO: 14) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 63B muestra las regiones de contacto entre el MASP-3 humano y el mAb 10D12 de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 498 a 509 (SEQ ID NO: 9) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 64 muestra las regiones de contacto entre MASP-3 humano y mAb 13B1de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 494 a 508 (SEQ ID NO: 10) y los residuos de aminoácidos 626 a 638 (SEQ ID NO: 12) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 65 muestra las regiones de contacto entre MASP-3 humano y mAb 1B11 de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 435 a 447 (SEQ ID NO: 16), residuos de aminoácidos 454 a 464 (SEQ ID NO: 17). los residuos de aminoácidos 583 a 589 (SEQ ID NO: 21) y los residuos de aminoácidos 614 a 623 (SEQ ID NO: 22) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 66 muestra las regiones de contacto entre los mAbs 1E7, 1G4 y 2D7 de MASP-3 humanos y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 454 a 464 (SEQ ID NO: 17), los residuos de aminoácidos 514 a 523

(SEQ ID NO : 19) y los residuos de aminoácidos 667 a 678 (SEQ ID NO: 23) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 67 muestra las regiones de contacto entre los mAbs 15D9 y 2F5 de MASP-3 humanos y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos de aminoácidos 454 a 464 (SEQ ID NO: 17), los residuos de aminoácidos 479 a 493 (SEQ ID NO: 18), los residuos de aminoácidos 562 a 571 (SEQ ID NO: 20) y los residuos de aminoácidos 667 a 678 (SEQ ID NO: 23) de MASP-3, como se describe en el Ejemplo 18;

La FIGURA 68 ilustra gráficamente los resultados del modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones tratados con mAb 13B1 inhibidor de MASP-3 (10 mg / kg) de alta afinidad, mAb 1379 de Factor B (30 mg / kg) de alta afinidad o mAb de control de isotipo (10 mg / kg), como se describe en el Ejemplo 20;

La FIGURA 69 ilustra gráficamente la actividad de APC, según lo determinado por el MFI promedio en un ensayo de citometría de flujo que detecta el factor Bb en la superficie de las partículas de zimosán, en muestras de suero obtenidas de un grupo de tres monos cinomolgus a lo largo del tiempo después del tratamiento con mAb h13B1X de MASP-3 de alta afinidad, ya sea en presencia o ausencia de anticuerpo anti-factor D añadido en la muestra de suero, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 70 ilustra gráficamente la actividad de APC, determinada por la deposición de Bb en zimosán, en muestras de suero obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) tratados con una sola dosis intravenosa de 5 mg / kg de mAbs h4D5X, h10D12X o h13B1X inhibidores de MASP-3 de alta afinidad, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 71A ilustra gráficamente la actividad de APC, según lo determinado por Ba en fase líquida en muestras de suero obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) a lo largo del tiempo después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de mAbs h4D5X, h10D12X y h13B1X de 5 mg / kg, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 71B ilustra gráficamente la actividad de APC, según lo determinado por Bb en fase líquida en muestras de suero obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) a lo largo del tiempo después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de mAbs h4D5X, h10D12X y h13B1X de 5 mg / kg, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 71C ilustra gráficamente la actividad de APC, según lo determinado por C3a en fase líquida en muestras de suero obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) a lo largo del tiempo después del tratamiento

con una sola dosis intravenosa de mAbs h4D5X, h10D12X y h13B1X de 5 mg / kg, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 72A ilustra gráficamente la relación molar del objetivo (MASP-3) al anticuerpo inhibidor h4D5X de MASP-3 de alta afinidad en los momentos de la inhibición completa de APC, medida por Ba en fase líquida, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 72B ilustra gráficamente la relación molar del objetivo (MASP-3) al anticuerpo inhibidor h10D12X de MASP-3 de alta afinidad en los momentos de la inhibición completa de APC, medida por Ba en fase líquida, como se describe en el Ejemplo 21;

La FIGURA 72C ilustra gráficamente la relación molar del objetivo (MASP-3) al anticuerpo inhibidor h13B1X de MASP-3 de alta afinidad en los momentos de la inhibición completa de APC, medida por Ba en fase líquido, como se describe en el Ejemplo 21; y

La FIGURA 73 muestra un análisis por Western blot que analiza el nivel de pro-Factor D y Factor D en suero de un mono cynomolgus a lo largo del tiempo (horas) después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de mAb h13B1X de 5 mg / kg, como se describe en el Ejemplo 21.

DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 ADNc de MASP-3 humano
SEQ ID Nº: 2 proteína MASP-3 humana (con líder)
SEQ ID NO: 3 proteína MASP-3 de ratón (con líder)
SEQ ID Nº: 4 proteína MASP-3 de rata
SEQ ID Nº: 5 proteína MASP-3 de pollo
SEQ ID Nº: 6 proteína MASP-3 de conejo
SEQ ID Nº: 7 proteína MASP-3 de mono cynomolgus
SEQ ID Nº: 8 proteína MASP-1 humana (con líder)

Fragmentos de péptido del dominio MASP-3 SP humano:

SEQ ID NO: 9 (aa 498-509 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 10 (aa 494-508 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 11 (aa 544-558 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 12 (aa 626-638 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 13 (aa 639-649 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 14 (aa 704-713 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 15 (aa 498-508 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 16 (aa 435-447 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 17 (aa 454-464 de MASP-3 humano con líder)

SEQ ID NO: 18 (aa 479-493 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 19 (aa 514-523 de MASP-3 humano con líder)
SEQ ID NO: 20 (aa 562-571 de MASP-3 humano con líder)
SEQ ID NO: 21 (aa 583-589 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 22 (aa 614-623 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 23 (aa 667-678 de MASP-3 humana con líder)
SEQ ID NO: 24-39: regiones variables de la cadena pesada- ratón parental
SEQ ID NO: : 24 4D5_VH
SEQ ID NO: 25 1F3_VH
SEQ ID NO: 26 4B6_VH
SEQ ID NO: 27 1A10_VH
SEQ ID NO: 28 10D12_VH
SEQ ID NO: 29 35C1_VH
SEQ ID NO: 30 13B1_VH
SEQ ID NO: 31 1G4_VH
SEQ ID NO: 32 1E7_VH
SEQ ID NO: 33 2D7_VH
SEQ ID NO: 34 49C11_VH
SEQ ID NO: 35 15D9_VH
SEQ ID NO: 36 2F5_VH
SEQ ID NO: 37 1B11_VH
SEQ ID NO: 38 2F2_VH
SEQ ID NO: 39 11B6_VH
SEQ ID NO: 40-54: regiones variables de la cadena ligera- ratón parental
SEQ ID NO: 40 4D5_VL
SEQ ID NO: 41 1F3_VL
SEQ ID NO: 42 4B6 / 1A10_VL
SEQ ID NO: 43 10D12_VL
SEQ ID NO: 44 35C1_VL
SEQ ID NO: 45 13B1_VL
SEQ ID NO: 46 1G4_VL
SEQ ID NO: 47 1E7_VL
SEQ ID NO: 48 2D7_VL
SEQ ID NO: 49 49C11_VL
SEQ ID NO: 50 15D9_VL
SEQ ID NO: 51 2F5_VL
SEQ ID NO: 52 1B11_VL
SEQ ID NO: 53 2F2_VL

SEQ ID NO: 54 11B6_VL
SEQ ID NO: 55-140: regiones de marco de la cadena pesada (FR) y regiones determinantes de complementariedad (CDR) de mAbs de MASP-3 ratón parental
SEQ ID NO: 141-208: FR de la cadena ligera y CDR de mAbs de MASP-3 ratón parental
SEQ ID NO: 209-216: secuencias consenso de CDR
SEQ ID NO: 217-232: ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada (ratón parental)
SEQ ID NO: 233-247: ADN que codifica las regiones variables de la cadena ligera (ratón parental)
SEQ ID NO: 248: región variable de la cadena pesada humanizada 4D5_VH-14 (h4D5_VH-14)
SEQ ID NO: 249: región variable de la cadena pesada humanizada 4D5_VH-19 (h4D5_VH-19)
SEQ ID NO: 250: región variable de la cadena ligera humanizada 4D5_VL-1 (h4D5_VL-1)
SEQ ID NO: 251: región variable de la cadena pesada humanizada 10D12_VH-45 (h10D12_VH-45)
SEQ ID NO: 252: región variable de la cadena pesada humanizada 10D12_VH-49 (h10D12_VH-49)
SEQ ID NO: 253: región variable de la cadena ligera humanizada 10D12_VL-21 (h10D12-VL-21)
SEQ ID NO: 254: región variable de la cadena pesada humanizada 13B1_VH-9 (h13B1-VH-9)
SEQ ID NO: 255: región variable de la cadena pesada humanizada 13B1_VH-10 (h13B1-VH-10)
SEQ ID NO: 256: región variable de la cadena ligera humanizada 13B1-VL-1 (h13B1-VL-1)
SEQ ID Nº: 257: 4D5 y 13B1 LC-CDR1-NQ
SEQ ID Nº: 258: 4D5 y 13B1 LC-CDR1-NA
SEQ ID Nº: 259: 4D5 y 13B1 LC-CDR1-ST
SEQ ID NO: 260: consenso LC-CDR1 para 4D5, 13B1 tipo y variantes
SEQ ID NO: 261: 10D12 LC-CDR1-DE
SEQ ID NO: 262: 10D12 LC-CDR1-DA
SEQ ID Nº: 263: 10D12 LC-CDR1-GA
SEQ ID NO: 264-277: HC FR y CDR para 4D5, 10D12 y 13B1 humanizados
SEQ ID NO: 278: h4D5_VL-1-NA
SEQ ID N.º: 279: h10D12_VL-21-GA

SEQ ID NO: 280: h13B1_VL-1-NA
SEQ ID Nº: 281-287 LC FR y CDRs para 4D5, 10D12 y 13B1 humanizados
SEQ ID NO: 288-293: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada humanizada y variantes 4D5, 10D12, 13B1
SEQ ID NO: 294-299: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera humanizada y variantes 4D5, 10D12, 13B1
SEQ ID NO: 300: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) de DTLacO parental.
SEQ ID NO: 301: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon M3J5 específico de MASP-3
SEQ ID NO: 302: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon M3M1 específico de MASP-3
SEQ ID NO: 303: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL)de DTLacO
SEQ ID NO: 304: polipéptido de región variable de la cadena ligera (VL) del clon M3J5 específico de MASP-3
SEQ ID NO: 305: polipéptido de región variable de la cadena ligera (VL) del clon M3M1 específico de MASP-3
SEQ ID NO: 306: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon D14 de MASP-3
SEQ ID NO: 307: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) del clon D14 de MASP-3
SEQ ID NO: 308: polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) del clon 1E10 de MASP-1
SEQ ID NO: 309: polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL) del clon 1E10 de MASP-1
SEQ ID NO: 310: región constante de IgG4 humana
SEQ ID NO: 311: región constante de IgG4 humana con mutación S228P
SEQ ID NO: 312: región constante de IgG4 humana con mutación S228P_X
SEQ ID NO: 313: región constante de IgK humana

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "activación del complemento dependiente de MASP-3" comprende dos componentes: (i) la activación del factor B y el factor D dependiente de la MASP-3 lectina, comprendida en la activación del complemento mediada por LEA-1, se produce en presencia de Ca ++, que comúnmente conduce a la conversión de C3bB a C3bBb y de pro-factor D a factor D; y (ii) la conversión de factor B y factor D independiente de la lectina, que puede ocurrir en ausencia de Ca ++, lo que comúnmente conduce a la conversión de C3bB a C3bBb y de pro-factor D a factor D. Activación del complemento mediado por LEA-1 y la conversión independiente de lectina del factor B y el factor D se han determinado que causan opsonización y / o lisis. Si bien no desea estar vinculado por ninguna teoría en particular, se cree que solo cuando múltiples moléculas de C3b se asocian y se unen en estrecha proximidad, la convertasa C3 C3bBb cambia su especificidad de sustrato y escinde C5 como la convertasa C5 de vía alternativa denominada C3bBb (C3b) n.

Como se usa en el presente documento, el término "activación del complemento dependiente de MASP-2", también denominado en el presente documento como activación del complemento mediada por LEA-2, comprende la activación dependiente de lectina de MASP-2, que se produce en presencia de Ca ++, lo que lleva a la formación de la convertasa C3 de vía de lectina C4b2a y tras la acumulación del producto de escisión C3 C3b posteriormente a la convertasa C5 C4b2a (C3b) n, que se ha determinado que causa opsonización y / o lisis.

Como se usa en este documento, el término "comprensión tradicional de la vía alternativa" también se conoce como la "vía alternativa tradicional" se refiere a la vía alternativa antes del descubrimiento instantáneo aquí descrito, es decir, la activación del complemento que se desencadena, por ejemplo, por zimosán de las paredes celulares de hongos y levaduras, lipopolisacárido (LPS) de las membranas externas gramnegativas y eritrocitos de conejo, así como de muchos polisacáridos puros, virus, bacterias, células tumorales animales, parásitos y células dañadas, y que tradicionalmente se cree que surgen de la generación proteolítica espontánea de C3b del factor de complemento C3. Como se usa en el presente documento, la activación de la "vía alternativa tradicional", también denominada en este documento "la vía alternativa", se mide en tampón Mg ++ / EGTA (es decir, en ausencia de Ca ++).

Como se usa en este documento, el término "vía de la lectina" se refiere a la activación del complemento que se produce a través de la unión específica de proteínas de unión a carbohidratos séricos y no séricos que incluyen lectina de unión a manano (MBL), CL-11 y las ficolinas (H ficolina, M ficolina, o L ficolina). Como se describe en el presente documento, los inventores han descubierto que la vía de la lectina es impulsada por los dos brazos efectores, el brazo 1 de la vía de la lectina (LEA-1), que se sabe que es dependiente de la MASP-3, y el brazo 2 del efector de la vía de la lectina (LEA-2), que es dependiente de MASP-2. Como se usa en el presente documento, la activación de las vías de la lectina se evalúa utilizando tampones que contienen Ca ++.

Como se usa en el presente documento, el término "vía clásica" se refiere a la activación del complemento que se desencadena por un anticuerpo unido a una partícula extraña y requiere la unión de la molécula de reconocimiento C1q.

Como se usa en el presente documento, el término "HTRA-1" se refiere a la serina peptidasa requerimiento de alta temperatura serina proteasa A1.

Como se usa en este documento, el término "agente inhibidor de MASP-3" se refiere a cualquier agente que inhibe directamente la activación del complemento dependiente de MASP-3, incluidos los agentes que se unen o interactúan directamente con MASP-3, incluidos los anticuerpos MASP-3 y sus fragmentos de unión a MASP-3, péptidos naturales y sintéticos, sustratos competitivos, moléculas pequeñas, inhibidores de expresión e inhibidores naturales aislados, y también comprende los péptidos que compiten con MASP-3 por unirse a otra molécula de reconocimiento (por ejemplo, MBL, CL-11, H- ficolina, M-ficolina o L-ficolina) en la vía de la lectina. En una realización, el agente inhibidor de MASP-3 es específico de MASP-3, y no se une a MASP-1 o MASP-2. Un agente inhibidor que inhibe directamente la MASP-3 puede denominarse un agente inhibidor directo de la MASP-3 (por ejemplo, un anticuerpo MASP-3), mientras que un agente inhibidor que inhibe indirectamente la MASP-3 puede denominarse como un agente inhibidor de MASP-3 (por ejemplo, un anticuerpo MASP-1 que inhibe la activación de MASP-3). Un ejemplo de un agente inhibidor directo de MASP-3 es un agente inhibidor específico de MASP-3, como un agente inhibidor de MASP-3 que se une específicamente a una porción de MASP-3 humana (SEQ ID NO: 2) con una afinidad de unión de al menos 10 veces mayor que a otros componentes en el sistema del complemento. Otro ejemplo de un agente inhibidor directo de MASP-3 es un anticuerpo de MASP-3 de alta afinidad que se une específicamente al dominio de la serina proteasa de la MASP-3 humana (SEQ ID NO: 2), con una afinidad de menos de 500 pM y no se unen a MASP-1 humana (SEQ ID NO: 8). En una realización, un agente inhibidor de MASP-3 inhibe indirectamente la actividad de MASP-3, tal como, por ejemplo, un inhibidor de la

activación de MASP-3, que incluye un inhibidor de la activación de MASP-3 mediada por MASP-1 (por ejemplo, un anticuerpo de MASP-1 o fragmentos de unión a MASP-1 del mismo, péptidos naturales y sintéticos, moléculas pequeñas, inhibidores de la expresión e inhibidores naturales aislados, y también comprenden los péptidos que compiten con MASP-1 por unirse a MASP-3). En una realización preferida, un agente inhibidor de MASP-3, tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o un péptido de unión a antígeno inhibe la maduración del factor D mediada por MASP-3. En otra realización, un un agente inhibidor de MASP-3 inhibe la activación del factor B mediada por MASP-3. Los agentes inhibidores de MASP-3 útiles en el método de la invención pueden reducir la activación del complemento dependiente de MASP-3 en más del 10%, tal como más del 20%, más del 50% o más que 90%. En una realización, el agente inhibidor de MASP-3 reduce la activación del complemento dependiente de MASP-3 en más del 90% (es decir, dando como resultado una activación del complemento de MASP-3 de solo el 10% o menos). Se espera que la inhibición de MASP-3 bloquee, total o parcialmente, tanto la lisis como la opsonización relacionadas con LEA-1 y la conversión independiente de lectina del factor B y la lisis y opsonización relacionadas con el factor D.

En una realización, un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad se une al dominio de serina proteasa de MASP-3 (residuos de aminoácidos 450 a 728 de la SEQ ID NO: 2) con una afinidad de menos de 500 pM (por ejemplo, menos de 250 pM, menos de 100 pM, menos de 50 pM, o menos de 10 pM) e inhibe la vía alternativa de activación del complemento en la sangre de un sujeto mamífero en al menos un 50% (por ejemplo, al menos un 60% o al menos un 70%, o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95% o más).

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, como un polipéptido, a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítopo ubicado en la región variable (también denominada en este documento como el dominio variable) de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" comprende anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de los mismos, derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (por ejemplo, ratón, rata, conejo y primate, incluidos los humanos), o de un hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante o animales transgénicos (u otros métodos para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos), que se unen específicamente a un polipéptido objetivo, como, por ejemplo, los polipéptidos MASP-1, MASP-2 o MASP-3 o porciones de los mismos. No se pretende que el término "anticuerpo" esté limitado con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en que se produce (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animal transgénico, síntesis de péptidos,

etc.). Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos multiespecíficos, panespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos murinos; anticuerpos quiméricos, de ratón humano, de ratón primate, de primate humano monoclonal; y anticuerpos anti idiotipo, y puede ser cualquier anticuerpo intacto o fragmento del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" comprende no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos, como un anticuerpo de región variable única (dAb), u otros fragmentos de anticuerpos conocidos como Fab, Fab ', F (ab')$_2$, Fv y similares, de cadena simple (ScFv), variantes sintéticas de los mismos, variantes naturales, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bi-específicos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio o fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítopo) de la especificidad requerida.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto por aminoácidos (naturales y no naturales) que participan en la unión selectiva de un epítopo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos para el antígeno objetivo. El término "anticuerpo monoclonal" comprende no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también sus fragmentos (como Fab, Fab ', F (ab')$_2$, Fv), cadena simple (ScFv), variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítopo) de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un epítope. No pretende ser limitado en cuanto a la fuente del anticuerpo o la manera en que se produce (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos, etc. descritos anteriormente bajo la definición de "anticuerpo".

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

anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describen en este documento incluyen un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL), interpuestas respectivamente entre una cadena pesada y un conjunto de región de marco de cadena ligera (FR) que proporciona soporte a las CDR y define la relación espacial de las CDR entre sí. Como se usa en este documento, el término "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Procediendo desde el extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denotan como "CDR1", "CDR2" y "CDR3" respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión de antígenos incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera.

Como se usa en este documento, el término "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos residuos de FR pueden entrar en contacto con el antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables de plegar la región V en el sitio de unión al antígeno, particularmente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, ciertos residuos de aminoácidos y ciertas características estructurales están muy altamente conservados. A este respecto, todas las secuencias de la región V contienen un bucle de disulfuro interno de alrededor de 90 residuos de aminoácidos. Con las regiones V plegadas en un sitio de unión, las CDR se muestran como motivos de bucle de proyección que forman una superficie de unión a antígeno. En general, se reconoce que hay regiones estructurales conservadas de las FR que influyen en la forma plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras "canónicas", independientemente de la secuencia precisa de aminoácidos de CDR.

Las estructuras y ubicaciones de las regiones variables de inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a Kabat, EA, et al., Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 4ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en Internet (immuno.bme.nwu.edu.).

Como se usa en el presente documento, un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad derivadas de un anticuerpo de especie no humana (por ejemplo, roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se deriva de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 operativamente unido o fusionado de otra manera a una porción Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. En algunas realizaciones, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase diferente de Ig del anticuerpo parental, que incluye IgA (incluidas las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluidas las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM.

Como se usa en este documento, un "anticuerpo humanizado" es una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y / o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender regiones de variables completas fusionadas en dominios constantes o solo las CDR injertadas en las regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al epítopo pueden ser salvajes o pueden modificarse por una o más sustituciones de aminoácidos. Otro enfoque se centra no solo en proporcionar regiones constantes derivadas de seres humanos, sino también en modificar las regiones variables, así como para remodelarlas lo más cerca posible de la forma humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Un anticuerpo "se une específicamente" a un objetivo si se une con mayor afinidad y/o avidez que se une a otras sustancias. En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente al dominio de la serina proteasa de la MASP-3 humana (residuos de aminoácidos 450 a 728 de SEQ ID NO: 2). En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a uno o más de los epítopos descritos en la TABLA 4, TABLA 28 o mostrados en la FIGURA 62.

Como se usa en el presente documento, el término "lectina de unión a manano" ("MBL") es equivalente a la proteína de unión a manano ("MBP").

Como se usa en este documento, el "complejo de ataque a la membrana" ("MAC") se refiere a un complejo de los cinco componentes terminales del complemento (C5b combinado con C6, C7, C8 y C9) que se inserta en y rompe las membranas (también conocido como C5b9).

Como se usa en este documento, "un sujeto" incluye todos los mamíferos, incluidos sin limitación a humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores.

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

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

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

El término "oligonucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término también cubre aquellas oligonucleobases compuestas de nucleótidos naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), así como oligonucleótidos que tienen modificaciones no naturales.

Como se usa en este documento, un "epítopo" se refiere al sitio en una proteína (por ejemplo, una proteína MASP-3 humana) que está unida por un anticuerpo. Los "epítopos superpuestos" incluyen al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) residuos de aminoácidos comunes, incluidos los epítopos lineales y no lineales.

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

En algunas realizaciones, la proteína MASP-3 humana puede tener una secuencia de aminoácidos que es, o es mayor que, 70 (por ejemplo, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100)% idénticos a la proteína MASP-3 humana que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, los fragmentos peptídicos pueden ser al menos 6 (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, o 600 o más) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, al menos 6 residuos de aminoácidos contiguos en la SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, un fragmento de péptido antigénico de una proteína MASP-3 humana es menor que 500 (por ejemplo, menos de 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 o 6) residuos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, menos de 500 residuos de aminoácidos contiguos en la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, en el contexto de generar un anticuerpo que se une a MASP-3, los fragmentos peptídicos son antigénicos y retienen al menos el 10% (por ejemplo, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% , al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 99.5%, o el 100% o más) de la capacidad de la proteína de longitud completa para inducir una respuesta

antigénica en un mamífero (consulte más adelante en "Métodos para producir un anticuerpo").

El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando un software informático disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los parámetros apropiados para medir la alineación, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan, se pueden determinar mediante métodos conocidos.

En realizaciones representativas, la proteína MASP-3 humana (SEQ ID NO: 2) está codificada por la secuencia de ADNc expuesta como SEQ ID NO: 1. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia de ADNc descrita en la SEQ ID NO: 1 representa un alelo único de MASP-3 humano, y que se espera que se produzcan variaciones alélicas y empalme alternativo. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 1, incluidas las que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención. Las variantes alélicas de la secuencia MASP-3 pueden clonarse explorando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos de acuerdo con los procedimientos estándar, o pueden identificarse mediante la búsqueda de comparación de homología (por ejemplo, búsqueda de BLAST) de bases de datos que contienen dicha información.

Como se usa en este documento, una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

Como se usa en este documento, una "construcción de molécula de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico, ya sea de cadena simple o doble, que se ha modificado mediante la intervención humana para contener segmentos de ácido

nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

Como se usa en el presente documento, un "vector de expresión" es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de transcripción, un gen y un terminador de transcripción. La expresión génica generalmente se coloca bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen está "unido operativamente" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor central están vinculados operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" como se usa en el presente documento pretende especificar que el valor específico proporcionado puede variar en cierta medida, como una variación en el rango de ± 10%, preferiblemente ± 5%, más preferiblemente ± 2% se incluyen en el valor dado. Donde se establecen rangos, los puntos finales

Cuando se establecen rangos, los puntos finales se incluyen dentro del rango a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto.

Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" "el" y "la" incluyen aspectos plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una pluralidad de tales excipientes y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, la referencia a "un agente" incluye un agente, así como dos o más agentes; la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia a "una región marco" incluye una referencia a una o más regiones marco y sus equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Cada realización en esta especificación debe aplicarse *mutatis mutandis* a todas las demás realizaciones, a menos que se indique expresamente lo contrario. Se contempla que cualquier realización discutida en esta especificación se puede implementar con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención se pueden usar para conseguir los métodos de la invención.

II. LA VÍA DE LA LECTINA: UNA NUEVA COMPRENSIÓN

i. Resumen: la vía de la lectina ha sido redefinida

Como se describe en este documento, los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la vía de la lectina del complemento tiene dos brazos efectores para activar el complemento, ambos impulsados por complejos de activación de la vía de la lectina formados por componentes de reconocimiento de

carbohidratos (MBL, CL-11 y ficolinas): i) el brazo efector formado por las proteasas de serina asociadas a la vía de lectina MASP-1 y MASP-3, referidas aquí como "brazo efector 1 de la vía de lectina" o "LEA-1"; y (ii) el brazo efector de activación impulsado por MASP-2, denominado en este documento "brazo 2 de efector de la vía de la lectina" o "LEA-2". Tanto LEA-1 como LEA-2 pueden efectuar la lisis y/u opsonización.

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

La **FIGURA 1** ilustra esta nueva comprensión de las vías de activación del complemento. Como se muestra en la **FIGURA 1**, la LEA-1 es impulsada por la MASP-3 unida a la lectina, que puede activar el zimógeno del factor D a su forma activa y / o escindir el factor B unido a C3b o C3b (H_20), lo que lleva a conversión del complejo zimógeno C3bB en su forma enzimáticamente activa C3bBb. El factor D activado, generado por MASP-3, también puede convertir los complejos de zimógeno C3bB o C3b (H_20) en su forma enzimáticamente activa. MASP-1 es capaz de una rápida activación automática, mientras que MASP-3 no lo es. En muchos casos, MASP-1 es el activador de MASP-3.

Mientras que en muchos ejemplos las lectinas (es decir, MBL, CL-11 o ficolinas) pueden dirigir la actividad a las superficies celulares, la **FIGURA 1** también describe las funciones independientes de la lectina de MASP-3, MASP-1 y HTRA-1 en la activación del factor B y/o maduración del factor D. Al igual que con la forma asociada a lectina de MASP-3 en LEA-1, la forma independiente de lectina de MASP-3 es capaz de mediar la conversión de C3bB o C3b (H20) a C3bBb (ver también las **FIGURAS 29** y **30**) y pro-factor D a factor D (véase la **FIGURA 32**). MASP-1 (ver también la **FIGURA 32**) y la proteína no relacionada con MASP HTRA-1 también puede activar el factor D (Stanton et al., *Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration*, presentada en la Conferencia de la Asociación para la investigación en la visión y la oftalmología, el 4 de mayo de 2011, de manera que no se requiera un componente de lectina.

Por lo tanto, MASP-1 (a través de LEA-1 y formas independientes de lectina), MASP-3 (a través de LEA-1 y formas independientes de lectina), y HTRA-1 (solo independiente de lectina) son capaces de la activación directa o indirecta en uno o más puntos a lo largo de un eje del factor B, factor D de MASP-3. Al hacerlo, generan C3bBb, la convertasa C3 de la vía alternativa, y estimulan la producción y deposición

de C3b sobre superficies microbianas. La deposición de C3b desempeña un rol crítico en la opsonización, al etiquetar las superficies de los microbios para su destrucción por las células fagocíticas del huésped, como los macrófagos. Como ejemplo aquí (**FIGURAS 28A y 28B**), MASP-3 es crítico para la opsonización de *S. aureus*. La deposición de C3b se produce rápidamente en *S. aureus* expuesto a suero humano de una manera dependiente de MASP-3 (**FIGURAS 28A y 28B**).

Sin embargo, las contribuciones de LEA-1 y las funciones independientes de lectina de MASP-3, MASP-1 o HTRA-1 no se limitan a la opsonización. Como se muestra en el diagrama de la **FIGURA 1**, estos tres componentes también pueden causar la lisis celular por activación directa o indirecta del factor B, y la producción de C3b. Estos componentes forman complejos que generan la convertasa C5 de la vía alternativa, C3bBb $(C3b)_n$. Como se describe más adelante en este documento, el requisito para MASP-3 y MBL, pero no MASP-2 (y, por lo tanto, no LEA-2 en este ejemplo), en la lisis de *N. meningitidis* (ver **FIGURAS 11, 12 y 13)** demuestra un rol para la LEA-1 en lisis. En resumen, los resultados de opsonización obtenidos de los estudios de *S. aureus* y los resultados de lisis observados en los estudios de *N. meningitidis* respaldan el rol de LEA-1 en ambos procesos (como se muestra en el diagrama de la **FIGURA 1**). Además, estos estudios demuestran que tanto la opsonización como la lisis pueden resultar de la conversión de C3bB o C3b (H_2O) y / o de pro-factor D en factor D; por lo tanto, ambos procesos pueden ser resultados de los roles independientes de lectina de MASP-3, MASP-1 o HTRA-1. Por lo tanto, el modelo desarrollado por los inventores en la **FIGURA 1** admite el uso de inhibidores principalmente de MASP-3, pero también de MASP-1 y / o HTRA-1, para bloquear la opsonización y/o la lisis y para tratar patologías causadas por la desregulación de estos procesos.

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

El primer brazo efector de la vía de la lectina, LEA-1, está formado por las serina proteasas asociadas a la vía de la lectina MASP-1 y MASP-3. Como se describe en este documento, los inventores ahora han demostrado que, en ausencia de MASP-3 y en presencia de MASP-1, la vía alternativa no se activa de manera efectiva en las estructuras de superficie. Estos resultados demuestran que MASP-3 desempeña un rol previamente no revelado al iniciar la vía alternativa, y esto se confirma utilizando el suero 3MC deficiente en MASP-3 obtenido de pacientes con el raro trastorno autosómico recesivo 3MC (Rooryck C, et al., Nat Genet. 43 (3): 197-203 (2011)) con mutaciones que hacen que el dominio de la serina proteasa de MASP-3 sea disfuncional. Sobre la base de estos nuevos hallazgos, se espera que la activación del complemento que involucra la vía alternativa, como se define convencionalmente,

sea dependiente de MASP-3. De hecho, MASP-3, y su activación de LEA-1, pueden representar el iniciador hasta ahora esquivo de la vía alternativa.

Como se describe con más detalle en los Ejemplos 1-4 de este documento, en los sueros deficientes en MASP-2, los inventores observaron una mayor actividad de la activación de la vía alternativa dependiente de la lectina que resulta en una mayor actividad bactericida (es decir, actividad lítica) contra *N. meningitidis.* Si bien no deseamos estar limitados por ninguna teoría en particular, se cree que en ausencia de MASP-2, los complejos de reconocimiento de carbohidratos que contienen MASP-1 tienen más probabilidades de unirse cerca de los complejos de reconocimiento de carbohidratos que llevan MASP-3 para activar MASP-3. Se sabe que, en muchos casos, la activación de MASP-3 depende de la actividad de MASP-1, ya que MASP-3 no es una enzima autoactivadora y muy a menudo requiere que la actividad de MASP-1 se convierta de su forma de zimógeno en su forma enzimáticamente activa. MASP-1 (como MASP-2) es una enzima autoactivadora, mientras que MASP-3 no se activa automáticamente y, en muchos casos, necesita que la actividad enzimática de MASP-1 se convierta en su forma enzimáticamente activa. *Ver*, Zundel S, et al., *J Immunol*., 172 (7): 4342-50 (2004). En ausencia de MASP-2, todos los complejos de reconocimiento de la vía de lectina se cargan con MASP-1 o MASP-3. Por lo tanto, la ausencia de MASP-2 facilita la conversión mediada por MASP-1 de MASP-3 en su forma enzimáticamente activa. Una vez que se activa el MASP-3, el MASP-3 activado inicia la activación de la vía alternativa, ahora denominada activación "LEA-1", a través de una conversión mediada por el MASP-3 de C3bB a C3bBb y/o la conversión del pro-factor D al factor D. C3bBb, también conocida como la convertasa C3 de la vía alternativa, escinde moléculas adicionales de C3 produciendo la deposición de moléculas opsónicas de C3b. Si varios fragmentos de C3b se unen en estrecha proximidad al complejo de la convertasa de C3bBb, esto resulta en la formación de la convertasa C5 de la vía alternativa C3bBb (C3b)n, que promueve la formación de MAC. Además, las moléculas de C3b depositadas en la superficie forman nuevos sitios para la unión del factor B, que ahora pueden ser escindidos por el factor D y / o MASP-3 para formar sitios adicionales donde se pueden formar complejos de convertasa C3 y C5 de vía alternativa . Este último proceso es necesario para una lisis efectiva y no requiere lectinas una vez que se ha producido el depósito inicial de C3b. Una publicación reciente (Iwaki D. et al., *J Immunol* 187 (7): 3751-8 (2011)), así como los datos generados por los inventores (**FIGURA 30**) demuestran que la convertasa C3 de vía alternativa zimógeno complejo C3bB se convierte en su forma enzimáticamente activa por MASP-3 activado. Los inventores ahora han descubierto que la escisión mediada por MASP-3 del factor B representa un subcomponente de la

LEA-1 recién descrita, que promueve la formación de convertasa C3 de via alternativa dependiente de lectina C3bBb.

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

El segundo brazo efector de la vía de la lectina, LEA-2, está formado por la serina proteasa asociada a la vía de la lectina MASP-2. El MASP-2 se activa al unir los componentes de reconocimiento a su patrón respectivo, y también puede ser activado por el MASP-1, y posteriormente divide el componente del complemento C4 en C4a y C4b. Después de la unión del producto de escisión C4b al plasma C2, el C2 unido a C4b se convierte en el sustrato de una segunda etapa de escisión mediada por MASP-2 que convierte C2 unido a C4b en el complejo enzimáticamente activo C4bC2a y un pequeño fragmento de escisión C2b. C4b2a es la convertasa C3 convertidora de C3 de la vía de la lectina, que convierte el abundante componente plasmático C3 en C3a y C3b. C3b se une a cualquier superficie en estrecha proximidad mediante un enlace tioéster. Si varios fragmentos C3b se unen muy cerca del complejo de convertasa C3 C4b2a, esta convertasa altera su especificidad para convertir C5 en C5b y C5a, formando el complejo de C5 convertasa C4b2a (C3b)n. Si bien esta C5 convertasa puede iniciar la formación de MAC, se piensa que este proceso no es lo suficientemente efectivo para promover la lisis por sí solo. Más bien, las opsoninas C3b iniciales producidas por LEA-2 forman el núcleo para la formación de la nueva vía alternativa C3 convertasa y los sitios de C5 convertasa, que en última instancia conducen a una abundante formación de MAC y lisis. Este último evento está mediado por la activación del factor D del factor B asociado con el C3b formado por LEA-2 y, por lo tanto, depende de la LEA-1 en virtud del rol esencial de la MASP-1 en la maduración del factor D. También existe una la ruta de activación del bypass C4 dependiente de MASP-2 para activar C3 en ausencia de C4, que desempeña un rol importante en la fisiopatología de la lesión por isquemia-reperfusión, ya que los ratones deficientes en C4 no están protegidos de la lesión por isquemia-reperfusión mientras los ratones deficientes de MASP-2 lo están (Schwaeble et al., *PNAS*, 2011 *supra*). LEA-2 también está ligada a la vía de coagulación, que involucra la escisión de protrombina a trombina (vía común) y también la escisión del factor XII (factor Hageman) para convertirse en su forma enzimáticamente activa XIIa. El factor XIIa a su vez corta el factor XI a XIa (vía intrínseca). La activación de la vía intrínseca de la cascada de coagulación conduce a la formación de fibrina, que es de importancia crítica para la formación de trombos.

La **FIGURA 1** ilustra la nueva comprensión de la vía de lectina y la vía alternativa en función de los resultados proporcionados en este documento. La

FIGURA 1 delinea el rol de LEA-2 tanto en la opsonización como en la lisis. Si bien MASP-2 es el iniciador de la deposición de C3b "descendente" (y la opsonización resultante) en múltiples configuraciones dependientes de lectina fisiológicamente (**FIGURAS 18A, 18B, 18C**), también desempeña un rol en la lisis de bacterias sensibles al suero. Como se ilustra en la **FIGURA 1**, el mecanismo molecular propuesto responsable del aumento de la actividad bactericida del suero/plasma deficiente o pobre en MASP-2 para patógenos sensibles al suero como *N. meningitidis* es que, para la lisis de bacterias, los complejos de reconocimiento de la vía de lectina asociados con MASP-1 y MASP-3 tienen que unirse muy cerca entre sí en la superficie bacteriana, lo que permite a MASP-1 escindir MASP-3. A diferencia de MASP-1 y MASP-2, MASP-3 no es una enzima autoactivadora, pero, en muchos casos, requiere que la activación/escisión por MASP-1 se convierta en su forma enzimáticamente activa.

Como se muestra más adelante en la **FIGURA 1**, la MASP-3 activada puede escindir el factor B unido a C3b en la superficie del patógeno para iniciar la cascada de activación alternativa mediante la formación de la vía alternativa enzimáticamente activa C3 y C5 convertasas C3bBb y C3bBb (C3b) n, respectivamente. Los complejos de activación de la vía de la lectina que contienen MASP-2 no tienen parte en la activación de la MASP-3 y, en ausencia o después del agotamiento de la MASP-2, los complejos de activación de la vía de todas las lectinas se cargarán con MASP-1 o MASP -3. Por lo tanto, en ausencia de MASP-2, la probabilidad aumenta notablemente de que en la superficie microbiana, los complejos de activación de vía de la lectina que contienen MASP-1 y MASP-3 se ubicarán muy cerca unos de otros, lo que conduce a una mayor activación del MASP-3 y, por lo tanto, a una mayor tasa de escisión mediada por el MASP-3 del factor B ligado al C3b para formar las convertasas C3 y C5 de la vía alternativa C3bBb y C3bBb (C3b)n en la superficie microbiana. Esto conduce a la activación de las cascadas de activación de terminal C5b-C9 que forman el Complejo de Ataque de Membrana, compuesto por C5b unido a la superficie asociado con C6, C5bC6 asociado con C7, C5bC6C7 asociado con C8 y C5bC6C7C8, lo que lleva a la polimerización de C9 que se inserta en la estructura de la superficie bacteriana y forma un poro en la pared bacteriana, lo que conducirá a la destrucción osmolítica de la bacteria dirigida al complemento.

El núcleo de este nuevo concepto es que los datos proporcionados en este documento muestran claramente que los complejos de activación de la vía de la lectina conducen las siguientes dos rutas de activación distintas, como se ilustra en la **FIGURA 1**:

i) LEA-1: una ruta de activación dependiente de MASP-3 que inicia e impulsa la activación del complemento generando la convertasa de vía alternativa

C3bBb a través de la escisión inicial y la activación del factor B en las superficies del activador, que luego catalizará la deposición de C3b y la formación de la convertasa de vía alternativa C3bBb. La ruta de activación dirigida por MASP-3 juega un papel esencial en la opsonización y lisis de los microbios e impulsa la vía alternativa en la superficie de las bacterias, lo que lleva a tasas óptimas de activación para generar complejos de ataque de membrana; y

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

Además de su rol en la lisis, la ruta de activación dirigida por MASP-2 desempeña un papel importante en la opsonización bacteriana que lleva a que los microbios se recubran con C3b unido covalentemente y sus productos de escisión (es decir, iC3b y C3dg), que serán el objetivo de captación y muerte por los fagocitos portadores del receptor C3, tales como granulocitos, macrófagos, monocitos, células de microglía y el sistema reticuloendotelial. Esta es la ruta más efectiva de destrucción de bacterias y microorganismos que son resistentes a la lisis del complemento. Estos incluyen la mayoría de las bacterias grampositivas.

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

Si bien no desea estar limitado por ninguna teoría en particular, se cree que cada uno de (i) LEA-1, (ii) LEA-2 y (iii) activación independiente de la lectina del factor B y / o D conducen a la opsonización y/o la formacion de MAC con lisis resultante.

ii. <u>Antecedentes de MASP-1, MASP-2 y MASP-3.</u>

Actualmente se sabe que tres serina proteasas asociadas a lectina de unión a manano (MASP-1, MASP-2 y MASP-3) están asociadas en suero humano con la lectina de unión a manano (MBL). La lectina de unión a manano también se denomina "proteína de unión a manosa" o "lectina de unión a manosa" en la literatura reciente. El complejo MBL-MASP desempeña un rol importante en la inmunidad innata en virtud de la unión de MBL a estructuras de carbohidratos presentes en una amplia variedad de microorganismos. La interacción de MBL con matrices específicas de estructuras de carbohidratos provoca la activación de las proenzimas MASP que, a su vez, activan el complemento al dividir los componentes C4 y C2 del complemento para formar la convertasa C3 C3b2b (Kawasaki *et al., J. Biochem* 106: 483-489 (1989); Matsushita

& Fujita, *J. Exp Med*. 176: 1497-1502 (1992); Ji *et al., J. Immunol* 150: 571-578 (1993)).

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

MAp19 es un producto génico empalmado alternativamente del gen estructural para MASP-2 y carece de los cuatro dominios C-terminales de MASP-2, incluido el dominio de serina endopeptidasa. El transcrito de ARNm truncado que se expresa abundantemente y que codifica MAp19 se genera mediante un evento de corte / poliadenilación alternativo del gen MASP-2. Por un mecanismo similar, el gen MASP-1/3 da lugar a tres productos genéticos principales, las dos serina proteasas MASP-1 y MASP-3 y un producto génico truncado de 44 kDa denominado "MAp44" (Degn *et al. , J. Immunol* 183 (11): 7371-8 (2009); Skjoedt *et al., J Biol Chem* 285: 8234-43 (2010)).

MASP-1 se describió por primera vez como el componente proteasa P-100 del factor Ra reactivo en suero, que ahora se reconoce como un complejo compuesto de MBL más MASP (Matsushita et al., Collectins and Innate Immunity, (1996); Ji et al., J Immunol 150: 571-578 (1993). La capacidad de una endopeptidasa asociada a MBL dentro del complejo MBL-MASP para actuar sobre los componentes del complemento C4 y C2 de una manera aparentemente idéntica a la de la enzima C1s dentro el complejo C1q– $(Clr)_2$– $(Cls)_2$ de la vía clásica del complemento sugiere que existe un complejo MBL – MASP que es funcionalmente análogo al complejo C1q– $(C1r)_2$– $(C1s)_2$. El complejo C1q– $(C1r)_2$– $(C1s)_2$ se activa por la interacción de C1q con las regiones Fc del anticuerpo IgG o IgM presente en los complejos inmunes. Esto provoca la autoactivación de la proenzima C1r que, a su vez, activa la proenzima C1s que luego actúa sobre los componentes del complemento C4 y C2.

La estequiometría del complejo MBL-MASP difiere de la encontrada para el complejo C1q– $(C1r)_2$– $(C1s)_2$ en que los diferentes oligómeros de MBL parecen asociarse con diferentes proporciones de MASP-1 / MAp19 o MASP-2 / MASP -3 (Dahl *et al*., Immunity 15: 127-135 (2001). La mayoría de los MASP y MAp19 encontrados en el suero no están complejados con MBL (Thiel *et al., J Immunol* 165: 878-887 (2000)) y puede asociarse en parte con ficolinas, un grupo recientemente descrito de lectinas que tienen un dominio de tipo fibrinógeno capaz de unirse a residuos de N-acetilglucosamina en superficies microbianas (Le *et al., FEBS Lett* 425: 367

(1998); Sugimoto *et al. J. Biol Chem* 273: 20721 (1998)). Entre ellas, la L-ficolina humana, la H-ficolina y la M-ficolina se asocian con las MASP y con la MAp19 y pueden activar la vía de la lectina al unirse a las estructuras específicas de carbohidratos reconocidas por ficolinas (Matsushita *et al., J Immunol* 164: 2281-2284 (2000); Matsushita *et al., J Immunol* 168: 3502-3506 (2002)). Además de las ficolinas y MBL, a la colectina de lectina tipo MBL, llamada CL-11, ha sido identificada como una molécula de reconocimiento de la vía de la lectina (Hansen *et al. J Immunol* 185: 6096-6104 (2010); Schwaeble *et al. PNAS* 108: 7523-7528 (2011)). Hay evidencia abrumadora que subraya la importancia fisiológica de estas moléculas alternativas de reconocimiento de carbohidratos y, por lo tanto, es importante entender que la MBL no es el único componente de reconocimiento de la vía de activación de la lectina y que la deficiencia de la MBL no debe confundirse con la deficiencia de la lectina. La existencia de una posible variedad de complejos alternativos de reconocimiento de carbohidratos relacionados estructuralmente con MBL puede ampliar el espectro de estructuras microbianas que inician una respuesta directa del sistema inmunitario innato a través de la activación del complemento.

Todas las moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina se caracterizan por un motivo específico de unión a MASP dentro de su región de tallo homólogo a colágeno (Wallis *et al. J. Biol Chem* 279: 14065-14073 (2004)). El sitio de unión a MASP en MBL, CL-11 y ficolinas se caracteriza por un motivo distinto dentro de este dominio: Hyp-Gly-Lys-Xaa-Gly-Pro, donde Hyp es hidroxiprolina y Xaa es generalmente un residuo alifático. Las mutaciones puntuales en esta secuencia interrumpen la unión de MASP.

1. **Estructuras respectivas, secuencias, localización cromosómica y variantes de empalme de MASP-1 y MASP-3**

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático que ilustra la estructura de dominio del polipéptido MASP-1 humano (SEQ ID NO: 8), el polipéptido MASP-3 humano (SEQ ID NO: 2) y el polipéptido MAp44 humano y los exones que los codifican. Como se muestra en la **FIGURA 2**, las serina proteasas MASP-1 y MASP-3 consisten en seis dominios distintos dispuestos como se encuentran en C1r y C1s; es decir, (I) un dominio N-terminal C1r / C1s / erizo de mar VEGF / proteína morfogénica ósea (o CUBI); (II) un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF); (III) un segundo dominio CUB (CUBII); (IV y V) dos dominios de proteína de control del complemento (CCP1 y CCP2); y (VI) un dominio de serina proteasa (SP).

Las secuencias de aminoácidos derivadas de ADNc de MASP-1 humana y de ratón (Sato *et al., Int Immunol* 6: 665-669 (1994); Takada *et al., Biochem Biophys Res Commun* 196: 1003-1009 (1993); Takayama *et al., J. Immunol* 152: 2308-2316

(1994), MASP-2 humano, de ratón y de rata (Thiel *et al., Nature* 386: 506-510 (1997); Endo *et al., J Immunol* 161 : 4924-30 (1998); Stover *et al., J. Immunol* 162: 3481-3490 (1999); Stover *et al., J. Immunol* 163: 6848-6859 (1999)), así como MASP-3 humano (Dahl *et al., Immunity* 15: 127-135 (2001)) indican que estas proteasas son serina peptidasas que tienen la tríada característica de los residuos His, Asp y Ser dentro de sus dominios catalíticos putativos (Números de acceso de Genbank: MASP humana 1: BAA04477 .1 (SEQ ID NO: 8); MASP-1 de ratón: BAA03944; MASP-1 de rata: AJ457084; MASP-3 humana: AAK84071 (SEQ ID NO: 2); MASP-3 de ratón: AB049755, tal como se accede en el Genbank 15/02/2012 (SEQ ID NO: 3); MASP-3 de rata (SEQ ID NO: 4); MASP-3 de pollo (SEQ ID NO: 5); MASP-3 de conejo (SEQ ID NO: 6); Mono Cynomolgus (SEQ ID NO: 7) .

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

El polipéptido MASP-1 humano (SEQ ID NO: 8) y el polipéptido MASP-3 (SEQ ID NO: 2) surgen de un gen estructural (Dahl *et al., Immunity* 15: 127-135 (2001), que se ha mapeado a la región 3q27-28 del brazo largo del cromosoma 3 (Takada *et al., Genomics* 25: 757-759 (1995)). Los transcritos de ARNm de MASP-3 y MASP-1 se generan a partir del transcrito primario mediante un proceso alternativo de empalme/poliadenilación. El producto de traducción MASP-3 se compone de una cadena alfa, que es común tanto a MASP-1 como a MASP-3, y una cadena beta (el dominio de la serina proteasa), que es exclusiva de MASP-3. Como se muestra en la **FIGURA 2**, el gen MASP-1 humano abarca 18 exones. El ADNc de MASP-1 humano está codificado por los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16 , 17 y 18. Como se muestra más adelante en la **FIGURA 2**, el gen MASP 3 humano abarca doce exones. El ADNc de MASP 3 humano (establecido como SEQ ID NO: 1) está codificado por los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12. Un empalme alternativo resulta en una proteína denominada proteína asociada a MBL 44 ("MAp44)", que surge de los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

El polipéptido MASP-1 humano (SEQ ID NO: 8 del Genbank BAA04477.1) tiene 699 residuos de aminoácidos, que incluye un péptido líder de 19 residuos. Cuando se omite el péptido líder, la masa molecular calculada de MASP-1 es 76,976 Da. Como

se muestra en la **FIGURA 2**, la secuencia de aminoácidos de MASP-1 contiene cuatro sitios de glicosilación unidos a N. Los dominios de la proteína MASP 1 humana (con referencia a la SEQ ID NO: 8) se muestran en la **FIGURA 2** e incluyen un dominio N terminal C1r / C1s / erizo de mar VEFG / proteína morfogénica ósea (CUBI) (aa 25-137 de la SEQ. ID NO: 8), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (aa 139-181 de la SEQ ID NO: 8), un segundo dominio CUB (CUBII) (aa 185-296 de la SEQ ID NO: 8), así como un tándem de los dominios de proteína de control del complemento (CCP1 aa 301-363 y CCP2 aa 367-432 de la SEQ ID NO: 8) y un dominio de serina proteasa (aa 449-694 de la SEQ ID NO: 8).

El polipéptido MASP-3 humano (SEQ ID NO: 2, del Genbank AAK84071) tiene 728 residuos de aminoácidos (como se muestra en la FIGURA 3), que incluye un péptido líder de 19 residuos (mostrado como los residuos de aminoácidos subrayados en la Figura 3).

Cuando se omiten los péptidos líderes, la masa molecular calculada de MASP-3 es 81,873 Da. Como se muestra en la **FIGURA 2**, hay siete sitios de glicosilación con enlace N en MASP-3. Los dominios de la proteína MASP 3 humana (con referencia a la SEQ ID NO: 2) se muestran en la **FIGURA 2** e incluyen un dominio N-terminal C1r / C1s / erizo de mar VEGF / proteína morfogénica ósea (CUBI) (aa 25-137 de la SEQ. ID NO: 2), un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (aa 139-181 de la SEQ ID NO: 2), un segundo dominio CUB (CUBII) (aa 185-296 de la SEQ ID NO: 2), así como un tándem de los dominios de proteína de control del complemento (CCP1 aa 299-363 y CCP2 aa 367-432 de la SEQ ID NO: 2) y un dominio de serina proteasa (aa 450-728 de la SEQ ID NO: 2).

El producto de traducción MASP-3 está compuesto por una cadena alfa (cadena pesada), que contiene los dominios CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2 (cadena alfa: aa 1-448 de la SEQ ID NO: 2) que es común tanto para MASP-1 como para MASP-3, y una cadena ligera (cadena beta: aa 449-728 de la SEQ ID NO: 2), que contiene el dominio de la serina proteasa, que es exclusiva de MASP-3.

2. Comparación de secuencias de aminoácidos de MASP-3 de varias especies

La FIGURA 4 proporciona una alineación multiespecífica de MASP-3 que muestra una comparación de la proteína MASP-3 de longitud completa de humanos (SEQ ID NO: 2), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 7), rata (SEQ ID NO: 4).), murino (SEQ ID NO: 3), pollo (SEQ ID NO: 5) y conejo (SEQ ID NO: 6). La FIGURA 5 proporciona una alineación multiespecífica del dominio de serina proteasa (SP) del ser humano (aa 450-728 de la SEQ ID NO: 2); conejo (aa 450-728 de la SEQ ID NO: 6); murino (aa aa455-733 de la SEQ ID NO: 3); rata (aa 455-733 de la SEQ ID NO: 4) y pollo (aa aa448-730 de la SEQ ID NO: 5).

Como se muestra en la FIGURA 4, existe un alto nivel de conservación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido MASP-3 entre diferentes especies, particularmente en el dominio SP (FIGURA 5). Como se muestra más adelante en la FIGURA 5, la tríada catalítica (H en el residuo 497; D en el residuo 553 y S en el residuo 664 con referencia a MASP-3 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2) se conserva a través de las especies. La TABLA 1 resume el porcentaje de identidad del dominio MASP-3 SP en todas las especies.

TABLA 1: Porcentaje de identidad del dominio MASP-3 SP en todas las especies

	Cyno	Conejo	Rata	Ratón	pollo
Humano	95%	94%	92%	91%	79%
Cyno		94%	90%	90%	79%
Conejo			92%	92%	81%
Rata				97%	78%
ratón					78%

MASP-3 no tiene actividad proteolítica hacia los sustratos C4, C2 o C3. A la inversa, inicialmente se informó que MASP-3 actuaba como un inhibidor de la vía de la lectina (Dahl et al., *Immunity* 15: 127-135 (2001)). Esta conclusión puede haber llegado porque, a diferencia de MASP-1 y MASP-2, MASP-3 no es una enzima autoactivadora (Zundel S. et al., *J Immunol* 172: 4342-4350 (2004); Megyeri et al., *J. Biol. Chem*. 288: 8922–8934 (2013).

Recientemente, la evidencia de posibles funciones fisiológicas de MASP-1 y MASP-3 surgió de estudios con ratones transgénicos que utilizan una cepa de ratón con una deficiencia combinada de MASP-1 y MASP-3. Si bien los ratones knockout para MASP-1/3 tienen una vía de lectina funcional (Schwaeble et al., *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)), parecen carecer de actividad de la vía alternativa (Takahashi et al., *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). La falta de actividad de la vía alternativa parece deberse a un defecto de procesamiento del factor D del complemento, que es necesario para la actividad de la vía alternativa. En ratones knockout para MASP-1/3, todo el factor D está circulando como una pro-forma proteolíticamente inactiva, mientras que en el suero de ratones normales, prácticamente todo el factor D está en la forma activa. El análisis bioquímico sugirió que MASP-1 podría convertir el factor D del complemento de su forma zimógena en su forma enzimáticamente activa **(FIGURA 32**; Takahashi et al., *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). MASP-3 también escinde el pro-factor D y produce el factor D activo in vitro (**FIGURA 32**; Takahashi et al., *JEM* 207 (1): 29-37 (2010)). El factor D está presente como una enzima activa en circulación en individuos normales, y MASP-1 y MASP-3, así como HTRA-1, pueden ser responsables de esta activación. Además, los ratones con deficiencias combinadas de MBL y ficolina todavía producen niveles normales de factor D y tienen una vía

alternativa completamente funcional. Por lo tanto, estas funciones fisiológicas de MASP-1 y MASP-3 no implican necesariamente lectinas, y por lo tanto no están relacionadas con la vía de la lectina. La MASP-3 recombinante humana y de ratón también parece que escinde el factor B y apoya el depósito de C3 en *S. aureus in vitro* (**FIGURA 29**; Iwaki D. et al., *J Immunol* 187 (7): 3751-8 (2011)).

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

Las estructuras del fragmento catalítico de MASP-1 y MASP-2 se han determinado mediante cristalografía de rayos X. La comparación estructural del dominio de la proteasa MASP-1 con las de otras proteasas del complemento reveló la base de su especificidad de sustrato relajado (Dobó et al., J. Immunol 183: 1207-1214 (2009)). Si bien la accesibilidad del surco de unión al sustrato de MASP-2 está restringida por bucles de superficie (Harmat et al., *J Mol Biol* 342: 1533-1546 (2004)), MASP-1 tiene una bolsa abierta de unión de sustrato que se parece al de la tripsina. en lugar de otras proteasas complementarias. Una propiedad similar a la trombina de la estructura MASP-1 es el bucle inusualmente grande de 60 aminoácidos (bucle B) que puede interactuar con los sustratos. Otra característica interesante de la estructura MASP-1 es el puente salino interno entre el S1 Asp189 y Arg224. Un puente salino similar se puede encontrar en la bolsa de unión al sustrato del factor D, que puede regular su actividad proteasa. C1s y MASP-2 tienen especificidades de sustrato casi idénticas. Sorprendentemente, algunos de los ocho bucles de superficie de MASP-2, que determinan las especificidades del sustrato, tienen conformaciones

muy diferentes en comparación con las de C1s. Esto significa que las dos enzimas relacionadas funcionalmente interactúan con los mismos sustratos de una manera diferente. La estructura del zimógeno MASP-2 muestra un dominio de proteasa inactiva con un orificio de oxianión roto y una bolsa de unión al sustrato (Gál et al., *J Biol Chem* 280: 33435-33444 (2005)). Sorprendentemente, el zymogen MASP-2 muestra una actividad considerable en un sustrato de proteína grande, C4. Es probable que la estructura de zymogen MASP-2 sea bastante flexible, permitiendo la transición entre las formas inactiva y activa. Esta flexibilidad, que se refleja en la estructura, puede desempeñar un rol en el proceso de autoactivación.

El análisis de Northern blot indica que el hígado es la principal fuente de ARNm de MASP-1 y MASP-2. Usando una sonda de ADNc específica 5 'para MASP-1, se observó un transcrito de MASP-1 mayor a 4.8 kb y uno menor a aproximadamente 3.4 kb, ambos presentes en el hígado humano y de ratón (Stover et al., *Genes Immunity* 4: 374- 84 (2003)). El ARNm de MASP-2 (2.6 kb) y el ARNm de MAp19 (1.0 kb) se expresan abundantemente en el tejido hepático. MASP-3 se expresa en el hígado, y también en muchos otros tejidos, incluido el tejido neuronal (Lynch N. J. et al., *J Immunol* 174: 4998-5006 (2005)).

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

Datos de respaldo para la nueva comprensión, que subrayan las condiciones de ensayo tradicionales que carecen de Ca^{++} y los resultados obtenidos utilizando un conjunto más fisiológico de condiciones que incluyen Ca^{++}.

Se proporcionan varias líneas independientes de fuerte evidencia experimental que apunta a la conclusión de que la vía de activación de la vía de la lectina del complemento activa el complemento a través de dos mecanismos efectores independientes: i) LEA-2: una vía impulsada por MASP-2 que media la

opsonización dirigida por el complemento, quimiotaxis (Schwaeble et al., *PNAS* 108: 7523-7528 (2011)), y lisis celular, y ii) LEA-1: una nueva vía de activación dependiente de MASP-3 que inicia la activación del complemento generando la convertasa C3bBb de vía alternativa a través de la escisión y activación del factor B en las superficies del activador, que luego catalizará la deposición de C3b y la formación de la convertasa C3bBb de vía alternativa, que puede dar lugar a la lisis celular así como a la opsonización microbiana. Además, como se describe en este documento, la activación independiente de lectina del factor B y/o factor D por MASP-1, MASP-3 o HTRA-1, o una combinación de cualquiera de los tres, también puede conducir a la activación del complemento a través de la vía alternativa.

Una activación conducida por MASP-3 dependiente de la vía de lectina de la vía alternativa parece contribuir a la división mediada por el factor D bien establecida del factor B unido a C3b para lograr tasas de activación óptimas para la lisis dependiente del complemento a través de la cascada de activación terminal para lisar células bacterianas a través de la formación de complejos de ataque de membrana C5b-9 (MAC) en la superficie celular (**FIGURAS 12-13**). Este evento de velocidad limitada parece requerir una coordinación óptima, ya que es defectuoso en ausencia de actividad funcional de MASP-3, así como en ausencia de actividad funcional de factor D. Como se describe en los Ejemplos 1-4 de este documento, los inventores descubrieron esta función de la vía de lectina dependiente de MASP-3 cuando estudian el fenotipo de la deficiencia de MASP-2 y la inhibición de MASP-2 en modelos de ratones experimentales de infección por *N. meningitidis*. Los ratones con genes específicos, deficientes de MASP-2 y los ratones de tipo salvaje tratados con inhibidores de MASP-2 basados en anticuerpos fueron altamente resistentes a la infección experimental por *N. meningitidis* (ver las **FIGURAS 6-10**). Cuando la dosis infecciosa se ajustó para dar una mortalidad de aproximadamente el 60% en los compañeros de camada de tipo salvaje, todos los ratones deficientes en MASP-2 o los que se agotaron de MASP-2 eliminaron la infección y sobrevivieron (ver la **FIGURA 6** y la **FIGURA 10**). Este grado extremadamente alto de resistencia se reflejó en un aumento significativo de la actividad bactericida del suero en suero deficiente en MASP-2 o en suero de ratón con reducción de MASP-2. Otros experimentos demostraron que esta actividad bactericida dependía de la lisis bacteriana impulsada por vías alternativas. Los sueros de ratón deficientes de factor B, o factor D, o C3 no mostraron actividad bactericida hacia *N. meningitidis,* lo que indica que la vía alternativa es esencial para impulsar la cascada de activación terminal. Un resultado sorprendente fue que los sueros de ratón deficientes en MBL-A y MBL-C (ambas son las moléculas de reconocimiento de la vía de lectina que reconocen *N. meningitidis)*, así como los sueros de ratón deficientes de las serina

proteasas asociadas a la vía de lectina MASP-1 y MASP -3 habían perdido toda la actividad bacteriolítica hacia *N. meningitidis* (**FIGURA 13**). Un artículo reciente (Takahashi M. et al., *JEM* 207: 29-37 (2010)) y el trabajo presentado aquí (**FIGURA 32**) demuestran que MASP-1 puede convertir la forma de zimógeno del factor D en su forma enzimáticamente activa y puede en parte explicar la pérdida de actividad lítica a través de la ausencia de factor D enzimáticamente activo en estos sueros. Esto no explica la falta de actividad bactericida en ratones deficientes en MBL ya que estos ratones tienen factor D enzimáticamente activo normal (Banda et al., *Mol Imunol* 49 (1-2): 281-9 (2011)). Sorprendentemente, al analizar sueros humanos de pacientes con el raro trastorno autosómico recesivo 3MC (Rooryck C, et al., *Nat Genet*. 43 (3): 197-203) con mutaciones que hacen que el dominio de la serina proteasa de MASP-3 sea disfuncional, ninguna actividad bactericida contra *N. meningitidis* fue detectable (n.b: estos sueros tienen MASP-1 y factor D, pero no MASP-3).

La hipótesis de que el suero humano requiere que la actividad dependiente de la MASP-3 mediada por la vía de la lectina para desarrollar actividad bactericida está respaldada por la observación de que los sueros humanos deficientes en MBL también fallan en la lisis de *N. meningitidis* (**FIGURAS 11-12**). MBL es la única molécula de reconocimiento de vía de la lectina humana que se une a este patógeno. Como MASP-3 no se activa automáticamente, los inventores plantean la hipótesis de que la mayor actividad bacteriolítica en los sueros deficientes en MASP-2 podría explicarse por una activación favorecida de MASP-3 a MASP-1 ya que, en ausencia de MASP-2, todos los complejos de activación de la vía de lectina que se unen a la superficie bacteriana se cargarán con MASP-1 o MASP-3. Dado que la MASP-3 activada escinde tanto el factor D (**FIGURA 32**) como el factor B para generar sus respectivas formas enzimáticamente activas *in vitro* (**FIGURA 30** e Iwaki D., et al, *J. Immunol*.187 (7): 3751-3758 (2011)), la función más probable de MASP-3 es facilitar la formación de la convertasa C3 de vía alternativa (es decir, C3bBb).

Si bien los datos para el rol dependiente de la lectina son convincentes, múltiples experimentos sugieren que MASP-3 y MASP-1 no estén necesariamente obligados a funcionar en un complejo con moléculas de lectina. Experimentos como el que se muestra en la **FIGURA 28B** demuestran la capacidad de MASP-3 para activar la vía alternativa (como lo demuestra la deposición de C3b en *S. aureus*) en condiciones (es decir, la presencia de EGTA) en las que no estarán presentes complejos con lectina. **La FIGURA 28A** demuestra que la deposición en estas condiciones depende del factor B, el factor D y el factor P, todos los componentes críticos de la vía alternativa. Además, la activación del factor D por MASP-3 y MASP-1 (**FIGURA 32**) y la activación del factor B por MASP-3 (**FIGURA 30**) pueden ocurrir

in vitro en ausencia de lectina. Finalmente, los estudios de hemólisis de eritrocitos de ratón en presencia de suero humano demuestran un rol claro tanto para MBL como para MASP-3 para la lisis celular. Sin embargo, la deficiencia de MBL no reproduce completamente la gravedad de la deficiencia de MASP-3, en contraste con lo que se esperaría si todas las MASP-3 funcionales se complejaran con MBL. Por lo tanto, los inventores no desean verse limitados por la noción de que todos los roles para MASP-3 (y MASP-1) demostrados en este documento pueden atribuirse únicamente a la función asociada con la lectina.

La identificación de los dos brazos efectores de la vía de la lectina, así como las posibles funciones independientes de la lectina de MASP-1, MASP-3 y HTRA-1, representan nuevas oportunidades para que las intervenciones terapéuticas traten eficazmente las patologías humanas definidas causadas por el exceso de activación del complemento en presencia de patógenos microbianos o células huésped alteradas o depósitos metabólicos. Como se describe en este documento, los inventores han descubierto ahora que en ausencia de MASP-3 y en presencia de MASP-1, la vía alternativa no se activa en las estructuras de la superficie (ver las **FIGURAS 15-16, 28B, 34-35A, B, 38-39**). Dado que la vía alternativa es importante para controlar los eventos que limitan la velocidad que conducen a la lisis bacteriana, así como a la lisis celular (Mathieson PW, et al., *J Exp Med* 177 (6): 1827-3 (1993)), nuestros resultados demuestran que El MASP-3 activado juega un papel importante en la actividad lítica del complemento. Como se muestra en las **FIGURAS 12-13, 19-21, 36-37 y 39-40**, en el suero de pacientes con 3MC que carecen de MASP-3 pero no de MASP-1, la cascada de activación terminal lítica del complemento es defectuosa. Los datos mostrados en las **FIGURAS 12** y **13** demuestran una pérdida de actividad bacteriolítica en ausencia de MASP-3 y/o actividad funcional de MASP-1/MASP-3. Asimismo, la pérdida de actividad hemolítica en el suero humano deficiente en MASP-3 (**FIGURAS 19-21, 36-37 y 39-40**), junto con la capacidad de reconstituir la hemólisis mediante la adición de MASP-3 recombinante (**FIGURAS 39-40**), apoya firmemente la conclusión de que la activación de la vía alternativa en las superficies objetivo (que es esencial para impulsar la lisis mediada por el complemento) depende de la presencia de MASP-3 activado. De acuerdo con la nueva comprensión de la vía de lectina detallada anteriormente, la activación de la vía alternativa de las superficies de destino depende de la LEA-1 y / o la activación independiente de lectina del factor B y / o factor D, que también está mediada por MASP-3 y, por lo tanto, los agentes que bloquean la activación del complemento dependiente de MASP-3 evitarán la activación de vías alternativas en las superficies de destino.

La divulgación del rol esencial de la iniciación dependiente de MASP-3 de la activación de una vía alternativa implica que la vía alternativa no es una vía

independiente, autónomo, de la activación del complemento como se describe esencialmente en todos los libros de textos médicos actuales y artículos de revisión recientes sobre el complemento. La opinión científica actual y ampliamente aceptada es que la vía alternativa se activa en la superficie de ciertos objetivos de partículas (microbios, zimosán y eritrocitos de conejo) a través de la amplificación de la activación de C3 espontánea "tick over". Sin embargo, la ausencia de activación de vías alternativas en los sueros de ratones con doble deficiencia de MASP-1 y MASP-3 y en el suero de pacientes humanos de 3MC en ambas placas recubiertas de zymosan y en dos bacterias diferentes (*N. meningitidis y S. aureus*), y la reducción de la hemólisis de los eritrocitos en los sueros con deficiencia de MASP-3 de ratones y humanos indican que el inicio de la activación de una vía alternativa en estas superficies requiere MASP-3 funcional. El rol requerido para MASP-3 puede ser dependiente de la lectina o –independiente, y conduce a la formación de la convertasa C3 de vía alternativa y complejos de convertasa C5, es decir, C3bBb y C3bBb (C3b)n, respectivamente. Por lo tanto, los inventores aquí revelan la existencia de rutas de iniciación previamente elusivas para la vía alternativa. Esta ruta de inicio depende de (i) LEA-1, un brazo de activación recién descubierto de la vía de la lectina, y/o (ii) roles independientes de la lectina de las proteínas MASP-3, MASP-1 y HTRA-1.

3. <u>El uso de agentes inhibidores de MASP-3 para el Tratamiento de enfermedades y condiciones relacionadas con vías alternativas.</u>

Como se describe en el presente documento, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad (por ejemplo, con una afinidad de unión de menos de 500 pM) que se ha demostrado que inhiben completamente la vía alternativa en sujetos mamíferos como roedores y no primates en concentraciones molares menores que la concentración del objetivo MASP-3 (por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 2,5: 1 (objetivo MASP-3 a mAb) (ver en los Ejemplos 11-21). Como se describe en el Ejemplo 11, una única administración de dosis de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad, mAb 13B1, a ratones condujo a una ablación casi completa de la actividad del complemento de la vía alternativa sistémica durante al menos 14 días. Como se describe con más detalle en el Ejemplo 12, en un estudio realizado en un modelo animal bien establecido asociado con la PNH. se demostró que el mAb 13B1 mejoró significativamente la supervivencia de los glóbulos rojos de tipo PNH y que los glóbulos rojos de la PNH protegidos mejoraron significativamente más que la inhibición de C5. Como se describe en el Ejemplo 13, se demostró además con más detalle que el mAb 13B1 redujo la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de artritis. Los resultados en este ejemplo demuestran que los mAbs 13B1, 10D12 y 4D5 inhibidores

de MASP-3 de alta afinidad son altamente efectivos para bloquear la vía alternativa en primates. La administración de dosis únicas de mAb 13B1, 10D12 o 4D5 a monos cynomolgus dio como resultado una ablación sostenida de la actividad de la vía alternativa sistémica que duró aproximadamente 16 días. El alcance de la ablación por vía alternativa en monos cinomolgos tratados con anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad fue comparable al alcanzado por el bloqueo del factor D *in vitro* e *in vivo*, lo que indica un bloqueo completo de la conversión del factor D por los anticuerpos inhibidores de MASP-3. Por lo tanto, los mAbs inhibidores de MASP-3 de alta afinidad tienen utilidad terapéutica en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades relacionadas con la hiperactividad de las vías alternativas.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir la vía alternativa en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio de la serina proteasa de la MASP-3 humana (residuos de aminoácidos 450 a 728 de la SEQ ID NO: 2) con alta afinidad (que tiene una K_D inferior a 500 pM), en una cantidad efectiva para inhibir la activación del complemento de la vía alternativa en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad o trastorno relacionado con la vía alternativa (es decir, una enfermedad o trastorno relacionado con la hiperactividad de la vía alternativa), tal como, por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular senil (AMD, incluida la AMD húmeda y seca), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aUSH), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) o TMA asociada al trasplante), asma, enfermedad de depósito denso, glomerulonefritis semilunar necrosante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), Retinopatía diabética, Uveítis, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo del trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, IgA Nefropatía y miastenia grave, como se describe más adelante.

A. EL PAPEL DE LA MASP-3 EN LA HEMOGLOBINURIA NOCTURNA PAROXISTICA Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-

3, DE MANERA OPCIONAL EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES MASP-2

Descripción de PNH

La hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), a veces también conocida como síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad adquirida y potencialmente mortal de la sangre. La PNH puede desarrollarse por sí sola, denominada "PNH primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea, como la anemia aplásica, denominada "PNH secundaria". La mayoría de los casos son de PNH primaria. La PNH se caracteriza por la destrucción inducida por el complemento de glóbulos rojos (hemólisis), recuento bajo de glóbulos rojos (anemia), trombosis e insuficiencia de la médula ósea. Los hallazgos de laboratorio en PNH muestran cambios compatibles con anemia hemolítica intravascular: baja hemoglobina, lactato deshidrogenasa elevada, recuento elevado de reticulocitos (células rojas inmaduras liberadas por la médula ósea para reemplazar las células destruidas), bilirrubina elevada (un producto de degradación de la hemoglobina) con la ausencia de anticuerpos de unión a RBC autorreactivos como una posible causa.

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

Aunque la hemólisis y la anemia son las características clínicas dominantes de la PNH, la enfermedad es un trastorno hematológico complejo que incluye además la trombosis y la aplasia medular como parte de los hallazgos clínicos (Risitano et al, Mini Reviews in Med Chem, 11:528-535 (2011)). A nivel molecular, la PNH es causada por la expansión clonal anormal de las células madre hematopoyéticas que carecen de un gen funcional PIG A. El PIG A es un gen ligado al X que codifica una glicosilfosfatidil inositol transferasa necesaria para la expresión estable en superficie

de glicoproteínas de clase A ancladas en el GPI, incluyendo CD55 y CD59. Por razones que se están investigando actualmente, las células madre hematopoyéticas con un gen PIG A disfuncional que surgen como resultado de mutaciones somáticas espontáneas pueden sufrir una expansión clonal hasta el punto en que su progenie constituye una parte significativa del conjunto de células hematopoyéticas periféricas. Mientras que tanto la progenie de eritrocitos como la de linfocitos del clon de células madre mutantes carecen de CD55 y CD59, sólo los glóbulos rojos se someten a una lisis abierta después de entrar en la circulación.

El tratamiento actual de la PNH incluye la transfusión de sangre para la anemia, la anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege a las células sanguíneas contra la destrucción inmunológica al inhibir el sistema del complemento (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-559 (2004)). Eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa sobre el componente del complemento C5, bloqueando su división por conversiones de C5, impidiendo así la producción de C5a y el ensamblaje del MAC. El tratamiento de los pacientes con eculizumab con PNH ha dado lugar a una reducción de la hemólisis intravascular, medida por la lactato-deshidrogenasa (LDH), lo que lleva a la estabilización de la hemoglobina y a la independencia de la transfusión en aproximadamente la mitad de los pacientes (Risitano et al, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11(6) (2011)). Aunque casi todos los pacientes que reciben tratamiento con eculizumab alcanzan niveles de LDH normales o casi normales (debido al control de la hemólisis intravascular), sólo un tercio de los pacientes alcanza un valor de hemoglobina de aproximadamente 11 g/dL, y los pacientes restantes que reciben eculizumab siguen presentando anemia de moderada a grave (es decir, dependiente de transfusiones), en proporciones casi iguales (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011), se demostró que los pacientes con PNH que tomaban eculizumab contenían grandes cantidades de fragmentos de C3 enlazados a los eritrocitos de la PNH (mientras que los pacientes que no recibían tratamiento no los tenían). Este hallazgo llevó al reconocimiento de que en los pacientes con PNH tratados con Soliris, los glóbulos rojos de la PNH que ya no están hemolizados debido al bloqueo de C5 ahora pueden acumular cantidades copiosas de fragmentos de C3 unidos a la membrana, que operan como opsoninas, lo que resulta en su atrapamiento en las células reticuloendoteliales a través de receptores específicos de C3 y la posterior hemólisis extravascular. Por lo tanto, mientras se previene la hemólisis intravascular y las secuelas resultantes, la terapia con eculizumab simplemente desvía la disposición de estos glóbulos rojos de la hemólisis intravascular a la extravascular, lo que resulta en una anemia residual

sustancial sin tratar en muchos pacientes (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas además del uso de eculizumab para aquellos pacientes que desarrollan hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3, ya que siguen necesitando transfusiones de glóbulos rojos. Estos enfoques de orientación de fragmentos C3 han demostrado su utilidad en sistemas experimentales (Lindorfer et al., Blood 115:2283-91, 2010).

Mecanismos de iniciación de complementos en la PNH

La relación causal entre la expresión superficial defectuosa de los reguladores negativos del complemento CD55 y CD59 en la PNH, combinada con la efectividad del eculizumab en la prevención de la hemólisis intravascular, definen claramente la PNH como una condición mediada por el sistema del complemento. Aunque este paradigma es ampliamente aceptado, la naturaleza de los eventos que inician la activación del complemento y la(s) vía(s) de activación del complemento involucrada(s) siguen sin resolverse. Debido a que el CD55 y el CD59 regulan negativamente los pasos de amplificación terminal en la cascada del complemento común a todas las vías de iniciación del complemento, la deficiencia de estas moléculas llevará a una formación exagerada y a la integración de la membrana de los complejos de ataque de la membrana, independientemente de si la activación del complemento se inicia por la vía de la lectina, por la vía clásica o por la rotación espontánea de la vía alternativa. Así, en los pacientes con PNH, cualquier evento de activación del complemento que lleve a la deposición de C3b en la superficie de los glóbulos rojos puede desencadenar una amplificación posterior y una hemólisis patológica (intravascular y/o extravascular) y precipitar una crisis hemolítica. Una clara comprensión mecanicista de los eventos moleculares que desencadenan la crisis hemolítica en los pacientes con PNH ha seguido siendo difícil de alcanzar. Debido a que ningún evento iniciador del complemento es claramente evidente en pacientes con PNH que sufren una crisis hemolítica, la opinión predominante es que la activación del complemento en la PNH puede ocurrir espontáneamente debido a la activación de bajo nivel de "tick-over" de la vía alternativa, que posteriormente se magnifica por el control inadecuado de la activación del complemento terminal debido a la falta de CD55 y CD59.

Sin embargo, es importante notar que en su historia natural, la PNH generalmente se desarrolla o se exacerba después de ciertos eventos, como una infección o una lesión (Risitano, Biologics 2:205-222 (2008)), los cuales han demostrado desencadenar la activación del complemento. Esta respuesta de activación del complemento no depende de la inmunidad previa del huésped frente al patógeno que lo incita y, por lo tanto, es probable que no implique la vía clásica. Más bien, parece que esta respuesta de activación del complemento se inicia por la

unión de la lectina a patrones de carbohidratos extraños o "autoalterados" expresados en la superficie de agentes microbianos o tejido huésped dañado. Así, los eventos que precipitan la crisis hemolítica en la PNH están estrechamente ligados a la activación del complemento iniciada a través de las lectinas. Esto hace muy probable que las vías de activación de la lectina proporcionen el desencadenante inicial que finalmente conduce a la hemólisis en los pacientes con PNH.

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

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

Al explorar el papel de la LEA-2 en las respuestas innatas de los huéspedes a los agentes microbianos, probamos patógenos adicionales. Se observó un resultado dramáticamente diferente cuando se estudió Neisseria meningitidis como organismo modelo. N. meningitidis también activa el complemento a través de las lectinas, y se requiere la activación del complemento para contener las infecciones por N. meningitidis en el huésped sin tratamiento previo. Sin embargo, el LEA-2 no desempeña ningún papel funcional de protección del huésped en esta respuesta: Como se muestra en las FIGURAS 6 y 7, el bloqueo de la LEA-2 mediante ablación

genética de la MASP-2 no reduce la supervivencia después de la infección por N. meningitidis. Por el contrario, el bloqueo de la LEA-2 por ablación con MASP-2 mejoró significativamente la supervivencia (FIGURAS 6 y 7) así como las puntuaciones de enfermedad (FIGURA 9) en estos estudios. El bloqueo de la LEA-2 por la administración de anticuerpos MASP-2 produjo el mismo resultado (FIGURA 10), eliminando los efectos secundarios o compensatorios en la cepa de ratón knockout como posible causa. Estos resultados favorables en animales con ablación LEA-2 se asociaron con una eliminación más rápida de N. meningitidis de la sangre (FIGURA 8). Además, como se describe aquí, la incubación de N. meningitidis con suero humano normal mató a N. meningitidis (FIGURA 11). La adición de un anticuerpo monoclonal funcional específico para la MASP-2 humano que bloquee la LEA-2, pero no la administración de un anticuerpo monoclonal de control de isotipo, puede mejorar esta respuesta de destrucción. Sin embargo, este proceso depende de las lectinas y al menos de un sistema de complemento parcialmente funcional, ya que el suero humano deficiente en MBL o el suero humano inactivado por calor fue incapaz de matar a N. meningitidis (FIGURA 11). Colectivamente, estos nuevos hallazgos sugieren que las infecciones por N. meningitidis en presencia de un sistema de complemento funcional son controladas por una vía de activación del complemento que depende de la lectina pero que es independiente de la LEA-2.

La hipótesis de que la LEA-1 puede ser la vía del complemento responsable de la destrucción de N. meningitidis dependiente de la lectina se probó utilizando una muestra de suero de un paciente de 3MC. Este paciente era homocigótico por una mutación sin sentido en el exón 12 del gen MASP-1/3. Como resultado, este paciente carecía de una proteína funcional MASP-3, pero por lo demás era suficiente complemento (el exón 12 es específico para la transcripción del MASP-3; la mutación no tiene efecto sobre la función del MASP-1 o los niveles de expresión) (ver *Nat Genet* 43(3):197-203 (2011)). El suero humano normal mata eficazmente a N. meningitidis, pero el suero inactivado por calor deficiente en MBL (una de las moléculas de reconocimiento de la vía de la Lectina) y el suero deficiente en MASP-3 fueron incapaces de matar a N. meningitidis (FIGURA 12). Por lo tanto, la LEA-1 parece mediar en la destrucción de N. meningitidis. Este hallazgo fue confirmado usando muestras de suero de cepas de ratón knockout. Mientras que el complemento que contenía suero normal de ratón mató fácilmente a N. meningitidis, el suero de ratón deficiente en MBL o MASP-1/3 fue tan ineficaz como el suero inactivado por calor que carece de complemento funcional (FIGURA 13). Por el contrario, el suero deficiente en MASP-2 mostró una destrucción eficiente de N. meningitidis.

Estos hallazgos proporcionan evidencia de una dualidad hasta ahora desconocida en la vía de la lectina al revelar la existencia de vías separadas LEA-2 y

LEA-1 de activación del complemento dependiente de la lectina. En los ejemplos detallados anteriormente, LEA-2 y LEA-1 no son redundantes y median resultados distintos y funcionales. Los datos sugieren que ciertos tipos de activadores de la vía de la lectina (incluyendo, pero no limitado a, S. pneumoniae) inician de preferencia la activación del complemento a través de LEA-2 que conduce a la opsonización, mientras que otros (ejemplificados por N. meningitidis) inician de preferencia la activación del complemento a través de LEA-1 y promueven los procesos citolíticos. Sin embargo, los datos no limitan necesariamente la LEA-2 a la opsonización y la LEA-1 a los procesos citolíticos, ya que ambas vías en otros entornos pueden mediar la opsonización y/o la lisis.

En el contexto de la activación del complemento dependiente de la lectina por N. meningitidis, los brazos de la LEA-2 y la LEA-1 parecen competir entre sí, ya que el bloqueo de la destrucción lítica del organismo in vitro por la LEA-2 aumenta la dependencia de la LEA-1 (FIGURA 13). Como se detalló anteriormente, este hallazgo puede explicarse por la mayor probabilidad de que los complejos de lectina MASP-1 residan muy cerca de los complejos de lectina MASP-3 en ausencia de MASP-2, lo que mejorará la activación de la LEA-1 y, por lo tanto, promoverá una lisis más efectiva de N. meningitidis. Debido a que la lisis de N. meningitidis es el principal mecanismo de protección en el huésped sin tratamiento previo, el bloqueo de LEA-2 in vivo aumenta la eliminación de N. meningitidis y conduce a una mayor destrucción.

Aunque los ejemplos discutidos anteriormente ilustran los efectos opuestos de la LEA-2 y la LEA-1 con respecto a los resultados después de la infección con N. meningitidis, puede haber otros entornos en los que tanto la LEA-2 como la LEA-1 se puedan sinergizar para producir un resultado determinado. Como se detalla a continuación, en otras situaciones de activación del complemento patológico a través de lectinas como las presentes en la PNH, la activación del complemento impulsada por la LEA-2 y la LEA-1 puede cooperar de manera sinérgica para contribuir a la patología general de la PNH. Además, como se describe en el presente documento, el MASP-3 también contribuye a la conversión independiente de la lectina de los factores B y D, lo que puede ocurrir en ausencia de Ca++, lo que comúnmente conduce a la conversión de C3bB a C3bBb y de pro-factor D a factor D, lo que puede contribuir aún más a la patología de la PNH.

Biología y actividad funcional esperada en la PNH

Esta sección describe los efectos inhibidores del bloqueo de la LEA-2 y LEA-1 sobre la hemólisis en un modelo in vitro de PNH. Los hallazgos apoyan la utilidad de los agentes bloqueadores de la LEA-2 (incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos que se unen y bloquean la función de la MASP-2) y los agentes bloqueadores de la LEA-1 (incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos que se unen y bloquean la función

de activación mediada por el MASP-1 de la MASP-3, MASP-3, o ambos) para tratar a los sujetos que sufren de uno o más aspectos de la PNH, y también el uso de inhibidores de la LEA-2 y/o LEA-1, y/o activación del complemento independiente de la lectina y dependiente de la MASP-3 (incluidos los inhibidores de la MASP-2, los inhibidores de la MASP-3 y los inhibidores de la MASP-2/MASP-3 o MASP-1/MASP-2 duales o biespecíficos, y los inhibidores de la MASP-1/MASP-2/MASP-3 panespecíficos) para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3 en pacientes con PNH que reciben tratamiento con un inhibidor de la C5, como el eculizumab.

Inhibidores MASP-2 para bloquear la opsonización y la hemólisis extravascular de los glóbulos rojos de la PNH a través del sistema reticuloendotelial

Como se ha detallado anteriormente, los pacientes con PNH se vuelven anémicos debido a dos mecanismos distintos de eliminación de los glóbulos rojos de la circulación: la hemólisis intravascular mediante la activación del complejo de ataque de membrana (MAC) y la hemólisis extravascular después de la opsonización con C3b y la eliminación posterior después de la unión y absorción del receptor del complemento por el sistema reticuloendotelial. La hemólisis intravascular se previene en gran medida cuando se trata a un paciente con eculizumab. Debido a que el eculizumab bloquea el mecanismo del efector lítico terminal que ocurre descendente tanto del evento de activación que inicia el complemento como de la opsonización subsiguiente, el eculizumab no bloquea la hemólisis extravascular (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). En cambio, los glóbulos rojos que se habrían sometido a hemólisis en pacientes con PNH no tratados ahora pueden acumular proteínas C3b activadas en su superficie, lo que aumenta la captación por parte del sistema reticuloendotelial y mejora su hemólisis extravascular. Por lo tanto, el tratamiento con eculizumab desvía eficazmente la disposición de los glóbulos rojos de la hemólisis intravascular a la posible hemólisis extravascular. Como resultado, algunos pacientes con PNH tratados con eculizumab siguen siendo anémicos. Por consiguiente, los agentes que bloquean la activación del complemento ascendente y previenen la opsonización de los glóbulos rojos de la PNH pueden ser particularmente adecuados para bloquear la hemólisis extravascular que se observa ocasionalmente con eculizumab.

Los datos microbianos presentados aquí sugieren que la LEA-2 es a menudo la ruta dominante para la opsonización dependiente de la lectina. Además, cuando la opsonización dependiente de la lectina (medida como deposición de C3b) fue evaluada en tres superficies prototípicas de activación de la lectina (manano, FIGURA 17A; zymosan, FIGURA 17B y S. pneumoniae; FIGURA 17C), la LEA-2 parece ser la ruta dominante para la opsonización dependiente de la lectina bajo condiciones

fisiológicas (es decir, en presencia de Ca++, donde todas las vías del complemento son operativas). Bajo estas condiciones experimentales, el suero deficiente en MASP-2 (que carece de LEA-2) es sustancialmente menos efectivo para opsonizar las superficies de prueba que el suero WT. El suero deficiente de MASP-1/3 (que carece de LEA-1) también está comprometido, aunque este efecto es mucho menos pronunciado en comparación con el suero que carece de LEA-2. La magnitud relativa de las contribuciones de la LEA-2 y la LEA-1 a la opsonización impulsada por la lectina se ilustra con más detalle en las FIGURAS 18A-18C. Mientras que se ha reportado que la vía alternativa del complemento apoya la opsonización de las superficies activadoras de la lectina en ausencia de la vía de la lectina o de la vía clásica (Selander et al., J Clin Invest 116(5):1425-1434 (2006)), la vía alternativa aislada (medida bajo condiciones de ensayo libres de Ca++) parece ser sustancialmente menos efectiva que los procesos iniciados por la LEA-2 y la LEA-1 descritos aquí. Por extrapolación, estos datos sugieren que la opsonización de los glóbulos rojos de la PNH también puede ser iniciada preferentemente por la LEA-2 y, en menor medida, por la LEA-1 (posiblemente amplificada por el bucle de amplificación de la vía alternativa), en lugar de ser el resultado de la activación de la vía alternativa independiente de la lectina. Por lo tanto, se puede esperar que los inhibidores de la LEA-2 sean más efectivos para limitar la opsonización y prevenir la hemólisis extravascular en la PNH. Sin embargo, el reconocimiento del hecho de que las lectinas distintas de la MBL, como las ficolinas, se unen a estructuras no carbohidratadas, como las proteínas acetiladas, y que la MASP-3 se asocia preferentemente con la H-ficolina (Skjoedt et al., *Immunobiol*. 215:921-931, 2010), deja abierta la posibilidad de que la LEA-1 desempeñe un papel significativo en la opsonización de glóbulos rojos asociada a la PNH también. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la LEA-1 tengan efectos antiopsonizantes adicionales, y se espera que la combinación de los inhibidores de la LEA-1 y la LEA-2 sea óptima y mediadora del beneficio de tratamiento más sólido para limitar la opsonización y la hemólisis extravascular en pacientes con PNH. Por lo tanto, el LEA-2 y el LEA-1 actúan de manera aditiva o sinérgica para promover la opsonización, y se espera que un inhibidor LEA-1/LEA-2 bi-específico o reactivo cruzado sea más efectivo para bloquear la opsonización y la hemólisis extravascular en la PNH.

Papel de los inhibidores de la MASP-3 en la PNH

Usando un modelo *in vitro* de PNH, demostramos que la activación del complemento y la hemólisis resultante en la PNH son efectivamente iniciadas por la activación de LEA-2 y/o LEA-1, y que no es una función independiente de la vía alternativa. Estos estudios utilizaron glóbulos rojos sensibilizados con manano de varias tinciones de ratón, incluyendo glóbulos rojos de ratones con deficiencia de Crry

(un importante regulador negativo de la vía terminal del complemento en ratones), así como glóbulos rojos de ratones con deficiencia de CD55/CD59, los cuales carecen de los mismos reguladores del complemento que están ausentes en los pacientes con PNH). Cuando los glóbulos rojos deficientes en Crry sensibilizados con manano se expusieron al suero humano complementario suficiente, los glóbulos rojos se hemolizaron eficazmente a una concentración sérica del 3% (FIGURA 19 y 20), mientras que el suero deficiente en complementos (IH: inactivado por calor) no era hemolítico. Sorprendentemente, el complemento de suero suficiente donde el LEA-2 fue bloqueado por la adición de anticuerpos MASP-2 había reducido la actividad hemolítica, y el suero del 6% era necesario para la hemólisis efectiva. Se hicieron observaciones similares cuando se probaron los glóbulos rojos deficientes en CD55/CD59 (FIGURA 22). El suero humano complementario suficiente suplementado con anticuerpos monoclonales MASP-2 (es decir, el suero en el que se suprime el LEA-2) fue aproximadamente dos veces menos efectivo que el suero no tratado para apoyar la hemólisis. Además, se necesitaban concentraciones más altas de suero bloqueado con LEA-2 (es decir, tratado con anticuerpos monoclonales antiMASP-2) para promover la hemólisis efectiva de los glóbulos rojos WT no tratados en comparación con el suero no tratado (FIGURA 21).

Aún más sorprendente, el suero de un paciente homocigótico de 3MC para una proteína MASP-3 disfuncional (y por lo tanto carente de LEA-1) fue completamente incapaz de hemolizar los glóbulos rojos deficientes en Crry sensibilizados al manano (FIGURA 20 y FIGURA 21). Se observó un resultado similar cuando se utilizaron glóbulos rojos normales no sensibilizados: Como se muestra en la FIGURA 21, el suero defectuoso LEA-1 aislado de un paciente de 3MC fue completamente ineficaz para mediar la hemólisis. Colectivamente, estos datos indican que mientras que la LEA-2 contribuye significativamente a la respuesta de la hemólisis intravascular, la LEA-1 es la vía predominante que inicia el complemento que conduce a la hemólisis. Por lo tanto, mientras que se espera que los agentes bloqueadores de la LEA-2 reduzcan significativamente la hemólisis intravascular de los glóbulos rojos en pacientes con PNH, se espera que los agentes bloqueadores de la LEA-1 tengan un efecto más profundo y eliminen en gran medida la hemólisis impulsada por el complemento.

Debe notarse que el suero del paciente con deficiencia de LEA-1 de 3MC utilizado en este estudio poseía una vía alternativa disminuida pero funcional cuando se probó bajo condiciones de ensayo de vía alternativa convencional (FIGURA 15). Este hallazgo sugiere que el LEA-1 hace una mayor contribución a la hemólisis que la actividad de la vía alternativa como se define convencionalmente en este entorno experimental de PNH. Por inferencia, está implícito que los agentes bloqueadores de

la LEA-1 serán al menos tan efectivos como los agentes que bloquean otros aspectos de la vía alternativa para prevenir o tratar la hemólisis intravascular en pacientes con PNH.

Función de los inhibidores de la MASP-2 en la PNH

Los datos aquí presentados sugieren los siguientes mecanismos patógenos para la anemia en la PNH: la hemólisis intravascular debido a la activación no regulada de los componentes terminales del complemento y la lisis de los glóbulos rojos por la formación de MAC, que se inicia predominantemente, aunque no exclusivamente, por la LEA-1, y la hemólisis extravascular causada por la opsonización de los glóbulos rojos por parte de C3b, que parece ser iniciada predominantemente por la LEA-2. Mientras que una función discernible para la LEA-2 en el inicio de la activación del complemento y la promoción de la formación del MAC y la hemólisis es aparente, este proceso parece ser sustancialmente menos efectivo que la activación del complemento iniciada por la LEA-1 que conduce a la hemólisis. Por lo tanto, se espera que los agentes bloqueadores de la LEA-2 reduzcan significativamente la hemólisis intravascular en pacientes con PNH, aunque se espera que esta actividad terapéutica sea sólo parcial. En comparación, se espera una reducción más sustancial de la hemólisis intravascular en pacientes con PNH para los agentes bloqueadores de la LEA-1.

La hemólisis extravascular, un mecanismo menos dramático, pero igualmente importante, de destrucción de los glóbulos rojos que conduce a la anemia en la PNH, es principalmente el resultado de la opsonización por parte de la C3b, la cual parece estar mediada predominantemente por la LEA-2. Por lo tanto, se puede esperar que los agentes bloqueadores de la LEA-2 bloqueen preferentemente la opsonización de los glóbulos rojos y la consiguiente hemólisis extravascular en la PNH. Se espera que esta actividad terapéutica única de los agentes bloqueadores de la LEA-2 proporcione un beneficio significativo en el tratamiento para todos los pacientes con PNH, ya que actualmente no existe ningún tratamiento para aquellos pacientes con PNH que experimentan este proceso patógeno.

Inhibidores de la LEA-2 como tratamiento complementario de los inhibidores de la LEA-1 o agentes bloqueadores del complemento terminal

Los datos aquí presentados detallan dos mecanismos patógenos para la eliminación de los glóbulos rojos y la anemia en la PNH que pueden ser abordados, por separado o en combinación, por distintas clases de agentes terapéuticos: la hemólisis intravascular iniciada predominantemente, aunque no exclusivamente, por la LEA-1 y que por lo tanto se espera que se prevenga de manera efectiva con un agente bloqueante de la LEA-1, y la hemólisis extravascular debido a la opsonización

de C3b impulsada predominantemente por la LEA-2, y por lo tanto, que es efectivamente prevenida por un agente bloqueador de la LEA-2.

Está bien documentado que tanto los mecanismos intravasculares como los extravasculares de la hemólisis conducen a la anemia en pacientes con PNH (Risitano et al., Blood 113:4094-4100 (2009)). Por lo tanto, se espera que un agente bloqueador de la LEA-1 que prevenga la hemólisis intravascular en combinación con un agente bloqueador de la LEA-2 que prevenga principalmente la hemólisis extravascular sea más efectivo que cualquiera de los dos agentes solos para prevenir la anemia que se desarrolla en los pacientes con PNH. De hecho, se espera que la combinación de los agentes bloqueadores de la LEA-1 y la LEA-2 prevenga todos los mecanismos relevantes de iniciación del complemento en la PNH y, por lo tanto, bloquee todos los síntomas de anemia en la PNH.

También se sabe que los agentes bloqueadores de C5 (como el eculizumab) bloquean eficazmente la hemólisis intravascular pero no interfieren con la opsonización. Esto deja a algunos pacientes con PNH tratados con anti-C5 con anemia residual sustancial debido a la hemólisis extravascular mediada por LEA-2 que permanece sin tratar. Por lo tanto, se espera que un agente bloqueador de C5 (como el eculizumab) que previene la hemólisis intravascular en combinación con un agente bloqueador de LEA-2 que reduce la hemólisis extravascular sea más efectivo que cualquiera de los dos agentes por sí solo en la prevención de la anemia que se desarrolla en los pacientes con PNH.

También se espera que otros agentes que bloquean el bucle de amplificación terminal del sistema del complemento que conducen a la activación de C5 y a la deposición de MAC (incluidos, entre otros, los agentes que bloquean la properdina, el factor B o el factor D o aumentan la actividad inhibidora del factor I, el factor H u otros factores inhibidores del complemento) inhiban la hemólisis intravascular. Sin embargo, no se espera que estos agentes interfieran con la opsonización mediada por la LEA-2 en pacientes con PNH. Esto deja a algunos pacientes con PNH tratados con tales agentes con anemia residual sustancial debido a la hemólisis extravascular mediada por LEA-2 que permanece sin tratar. Por lo tanto, se espera que el tratamiento con tales agentes que previenen la hemólisis intravascular en combinación con un agente bloqueador LEA-2 que minimiza la hemólisis extravascular sea más efectivo que cualquiera de los dos agentes solos para prevenir la anemia que se desarrolla en los pacientes con la PNH. De hecho, se espera que la combinación de tales agentes y un agente bloqueador LEA-2 prevenga todos los mecanismos relevantes de destrucción de los glóbulos rojos en la PNH y, por lo tanto, bloquee todos los síntomas de anemia en la PNH.

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

Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y la LEA-2, y por lo tanto en combinación bloquean todos los eventos de activación del complemento que median tanto la hemólisis intravascular como la extravascular, proporcione el mejor resultado clínico para los pacientes con la PNH. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tiene actividad de bloqueo de la LEA-1 junto con un anticuerpo que tiene actividad de bloqueo de la LEA-2. En algunas encarnaciones, las actividades de bloqueo de la LEA-1 y la LEA-2 se combinan en una sola entidad molecular, y que dicha entidad con la actividad combinada de bloqueo de la LEA-1 y la LEA-2 bloqueará eficazmente la hemólisis intravascular, así como la extravascular, y prevendrá la anemia en la PNH. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente el MASP-1 y bloquea el LEA-1 y disminuye el LEA-2, y el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente el MASP-2 y otros bloques del LEA-2. Alternativamente, tal entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente el MASP-3 y por lo tanto bloquea el LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente el MASP-2 y bloquea el LEA-2. Una entidad de este tipo puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente tanto el MASP-1 como el MASP-3 y, por lo tanto, bloquea el LEA-1 y disminuye el LEA-2, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente el MASP-2 y bloquea además el LEA-2. Basado en las similitudes en la secuencia y arquitectura general de la proteína, también se puede prever que se pueda desarrollar un anticuerpo convencional con dos sitios de unión idénticos que se une específicamente al MASP-1 y al MASP-2 y al MASP-3 de una manera funcional, logrando así el bloqueo funcional de la LEA-1 y de la LEA-2. Se espera que un anticuerpo con actividad inhibidora pan-MASP bloquee tanto la hemólisis intravascular como la extravascular y, por lo tanto, trate eficazmente la anemia en pacientes con PNH.

Como se describe en los Ejemplos 11-21, se han generado anticuerpos inhibidores MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la PNH.

Por consiguiente, en una realización, la invención presente proporciona un método para tratar un sujeto que sufre de, o en riesgo para desarrollar PNH que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un

fragmento de unión al antígeno del mismo, según lo revelado en el presente documento, el cual se une a MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de PNH en el sujeto.

En una realización, la invención presente proporciona un método para tratar un sujeto que sufre de, o en riesgo para desarrollar la hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), que comprenda la administración al sujeto de una composición farmacéutica que comprenda una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento de unión de antígenos del mismo, tal como se indica en el presente documento, que se vincule al MASP-3 humano e inhiba la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de la PNH en el sujeto de que se trate, tales como, cuando el dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la misma comprendan (a) Una región de variables de cadenas pesadas formada por: (i) VHCDR1 que incluya SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2, que incluya SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275, y (iii) VHCDR3, que incluya SEQ ID NO:88, y (b) una región de variables de la cadena de luz, que incluya : (i) VLCDR1, que incluya SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259, (ii) VLCDR2, que incluya SEQ ID NO:144 y (iii) VLCDR3, que incluya SEQ ID NO:161.En algunas realizaciones, la composición farmacéutica aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto que sufre de PNH. En algunas realizaciones, en las que el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar PNH exhibe uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en (i) niveles de hemoglobina por debajo de lo normal, (ii) niveles de plaquetas por debajo de lo normal; (iii) niveles de reticulocitos por encima de lo normal, y (iv) niveles de bilirrubina por encima de lo normal. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra sistémicamente (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial o como inhalante) a un sujeto que sufre o corre el riesgo de desarrollar la PNH. En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de padecer PNH ha sido previamente sometido, o está actualmente bajo tratamiento con un inhibidor terminal del complemento que inhibe la división de la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración al sujeto de un inhibidor terminal del complemento que inhibe la división de la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el inhibidor terminal del complemento es un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de éste que se une al antígeno. En algunas realizaciones, el inhibidor terminal del complemento es eculizumab.

B. EL PAPEL DE LA MASP-3 EN LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES DE LA MASP-2

La degeneración macular relacionada con la edad (ADM) es la principal causa de discapacidad visual y ceguera en los ancianos y representa hasta el 50% de los casos de ceguera en los países desarrollados. La prevalencia de la AMD es de alrededor del 3% en adultos y aumenta con la edad, de manera que casi dos tercios de la población mayor de 80 años tendrán algunos signos. Se estima que más de 1,75 millones de personas en los Estados Unidos tienen AMD avanzada y la prevalencia está aumentando a medida que la población envejece y se espera que alcance casi 3 millones para el año 2020 (Friedman, D.S., et al., Arch. Ophthalmol. 122:564-572, 2004). La AMD es una anormalidad del epitelio del pigmento retiniano (RPE) que provoca la degeneración de los fotorreceptores de la retina o mácula central superpuesta y la pérdida de la visión central. Las formas tempranas e intermedias de AMD se caracterizan por depósitos progresivos de drusas, un material amarillento que contiene lípidos, proteínas, lipoproteínas y restos celulares, en el espacio subretiniano adyacente al RPE, junto con irregularidades pigmentarias en la retina. La AMD avanzada consiste en dos subtipos clínicos: AMD no neovascular geográfica atrófica ("seca") y AMD neovascular exudativa ("húmeda"). Aunque la AMD seca representa entre el 80% y el 90% de la AMD avanzada, la mayor parte de la pérdida súbita y grave de la visión se produce en pacientes con AMD húmeda. No se sabe si los dos tipos de AMD representan fenotipos diferentes derivados de patologías similares o de dos condiciones distintas. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) no ha aprobado ninguna terapia para tratar la AMD seca. Las opciones de tratamiento aprobadas por la FDA para la AMD húmeda incluyen inyecciones intravítreas de medicamentos antiangiogénicos (ranibizumab, pegaptanib sódico, aflibercept), terapia con láser, terapia con láser fotodinámico y telescopio implantable.

La etiología y la fisiopatología de la AMD son complejas y no se comprenden completamente. Varias líneas de evidencia apoyan el rol de la desregulación del sistema del complemento en la patogénesis de la AMD. Los estudios de asociación de genes han identificado múltiples loci genéticos asociados con la AMD, incluyendo la codificación de genes para una variedad de proteínas, factores y reguladores del complemento. La asociación más fuerte es con polimorfismos en el gen del factor complemento H (CFH), con la variante Y402H homocigotos que tienen aproximadamente 6 veces y heterocigotos aproximadamente 2,5 veces mayor riesgo de desarrollar AMD en comparación con el genotipo sin riesgo (Khandhadia, S., et al., *Immunobiol*. 217:127-146, 2012). Las mutaciones en otras vías del complemento que codifican genes también se han asociado con un aumento o una disminución del riesgo de AMD , incluyendo el factor B del complemento (CFB), C2,

C3, el factor I y las proteínas 1 y 3 relacionadas con la CFH (Khandhadia et al.). Estudios inmunohistoquímicos y proteómicos en ojos de donantes de pacientes con AMD mostraron que las proteínas de la cascada del complemento se incrementan y localizan en drusas (Issa, P.C., et al., Graefes, Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 249:163-174, 2011). Además, los pacientes con AMD han aumentado la activación sistémica del complemento medida en la sangre periférica (Issa et al., 2011, supra).

La vía alternativa del complemento parece ser más relevante que la vía clásica en la patogénesis de la AMD. C1q, el componente esencial de reconocimiento para la activación de la vía clásica, no fue detectado en drusas por los análisis inmunohistoquímicos (Mullins et al., *FASEB J*. 14:835 846, 2000; Johnson et al., Exp. Eye Res. 70:441 449, 2000). Los estudios de asociación genética han implicado a los genes CFH y CFB. Estas proteínas están involucradas en el bucle de amplificación de la vía alternativa, siendo CFH un inhibidor de fase fluida y CFB un componente activador de proteasa de la vía alternativa. La variante Y402H de la CFH afecta la interacción con la unión de ligandos, incluyendo la unión con la proteína C reactiva, heparina, proteína M y glucosaminoglicanos. Esta unión alterada a los ligandos puede reducir la unión a las superficies celulares, lo que a su vez puede llevar a una reducción de la degradación mediada por el factor I del fragmento de activación C3b y a una regulación alterada de la convertasa C3 alternativa, lo que resulta en una sobreactivación de la vía alternativa (Khandhadia et al., 2012, supra). Las variaciones en el gen CFB se asocian con un efecto protector para el desarrollo de la AMD. Una variante funcional fB32Q tenía 4 veces menos afinidad vinculante a C3b que la variante de riesgo fB32R, lo que resultó en una reducción en la formación de la convertasa C3 (Montes, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106:4366-4371, 2009).

Mecanismos de iniciación de complementos en la AMD

Los estudios de vinculación genética humana analizados anteriormente sugieren un rol importante para el sistema de complemento en la patogénesis de la AMD. Además, los productos de activación del complemento están abundantemente presentes en las drusas (Issa, P.C., et al., Graefes, Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 249:163-174, 2011), una lesión patológica distintiva tanto en la AMD húmeda como en la seca. Sin embargo, la naturaleza de los eventos que inician la activación del complemento, y la(s) vía(s) de activación del complemento involucrada(s) permanece incompletamente comprendida.

Es importante señalar que los depósitos de drusas están compuestos de residuos celulares y productos de desecho oxidativos que se originan en la retina y que se acumulan debajo del RPE a medida que el ojo envejece. Además, el estrés oxidativo parece jugar un rol importante (Cai et al; Front Biosci., 17:1976-95, 2012),

y se ha demostrado que causa activación del complemento en el RPE (J Biol Chem., 284(25):16939-47, 2009). Es ampliamente apreciado que tanto el estrés oxidativo como las lesiones celulares o tisulares activan las lectinas del sistema del complemento. Por ejemplo, Collard et al. han demostrado que las células endoteliales expuestas al estrés oxidativo desencadenan una deposición abundante de complemento mediada por las lectinas (Collard CD et al., Mol Immunol., 36(13-14):941-8, 1999; Collard C.D. et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56, 2000), y que el bloqueo de la unión de la lectina y la activación del complemento dependiente de la lectina mejora los resultados en modelos experimentales de lesión por estrés oxidativo (Collard C.D. et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56, 2000).

Por lo tanto, parece probable que los productos de desecho oxidativos presentes en las drusas también activan el complemento a través de las lectinas. Por inferencia, la activación del complemento dependiente de la lectina puede desempeñar un rol fundamental en la patogénesis de la AMD.

Se ha evaluado el papel del sistema de complemento en modelos de ratón de AMD. En el modelo de ratón con daños causados por la luz, un modelo experimental para la degeneración del fotorreceptor mediada por el estrés oxidativo, los ratones knockout con una eliminación de la vía clásica (C1qα-/- sobre un fondo C57BL/6) tenían la misma sensibilidad al daño causado por la luz en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre, mientras que la eliminación del factor complementario D de la vía alternativa (CFD-/-) resultó en una protección contra el daño causado por la luz (Rohrer, B. et al, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48:5282-5289, 2007). En un modelo de ratón de neovascularización coroidal (CNV) inducida por fotocoagulación con láser de la membrana de Bruch, los ratones knockout sin complemento Factor B (CFB-/-) fueron protegidos contra la CNV en comparación con ratones de tipo silvestre (Rohrer, B. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50:3056-3064, 2009). En el mismo modelo, la administración intravenosa de una forma recombinante del complemento Factor H dirigida a sitios de activación del complemento (CR2-fH) redujo la extensión de la CNV. Este efecto protector se observó tanto si se administró CR2-fH en el momento de la lesión por láser o terapéuticamente (después de la lesión por láser). Una versión terapéutica humana de CR2-fH (TT30) también fue eficaz en el modelo de CNV murina (Rohrer, B. et al. J. Ocul. Pharmacol. Ther.,28:402-409, 2012). Debido a que el fB es activado por la LEA-1, y debido a que MASP-1 y MASP-3 contribuyen a la maduración del factor D, estos hallazgos implican que los inhibidores de la LEA-1 pueden tener beneficios terapéuticos en pacientes con AMD. Además, los resultados recientes obtenidos en un estudio de fase 2 han demostrado que la inyección intravítrea mensual con Lampalizumab (anteriormente conocida como FCFD4514S y anti-factor D, que es un

fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el Factor D) reduce la progresión del área de la atrofia geográfica en los pacientes que sufren de atrofia geográfica secundaria a la AMD (Yaspan B.L. et al., Sci Transl. Med. 9, Edición 395, 21 de junio de 2017).

Los estudios experimentales iniciales en un modelo de roedores de AMD que utilizaban ratones con deficiencia de MBL no apoyaron un papel crítico para la vía de la lectina en la activación del complemento patógeno (Rohrer et al., Mol Immunol. 48:e1-8, 2011). Sin embargo, la MBL es sólo una de varias lectinas, y otras lectinas distintas de la MBL pueden desencadenar la activación del complemento en la AMD. De hecho, nuestro trabajo anterior ha demostrado que la MASP-2, la proteasa serina limitante de la velocidad que se requiere críticamente para la función de la vía de la lectina, desempeña un papel crítico en la AMD. Como se describe en la patente estadounidense nº 7,919,094 (asignada a Omeros Corporation), incorporada aquí por referencia, los ratones con deficiencia de MASP-2 y los ratones tratados con anticuerpos MASP-2 estaban protegidos en un modelo de ratón de CNV inducida por láser, un modelo preclínico validado de AMD húmeda (Ryan et al., Tr Am Opth Soc LXXVII:707-745, 1979). Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la LEA-2 prevengan eficazmente la CNV y mejoren los resultados en los pacientes con AMD.

Por lo tanto, en vista de lo anterior, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan un beneficio terapéutico independiente en la AMD. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención así proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar la degeneración macular senil (formas húmeda y seca) mediante la administración de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente inhibidor de MASP 1, un agente inhibidor de MASP 3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP 1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que sufre de tal condición. La composición inhibidora de MASP 1, MASP 3 o MASP 1/3 puede administrarse localmente al ojo, como por irrigación, administración intravítrea o aplicación de la composición en forma de gel, bálsamo o gotas.

Alternativamente, el agente inhibidor MASP 1, MASP 3 o MASP 1/3 puede ser administrado al sujeto sistémicamente, por ejemplo, por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 en un sujeto que padece degeneración macular senil, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor MASP -1, MASP-3 o MASP1 / 3 para el sujeto que lo necesite. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloqueen individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en pacientes con AMD en comparación con la inhibición de la LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1 y LEA-2 se combinan en una sola entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo de LEA-1 y LEA-2 combinada. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo bi-específico cuando un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente a MASP-1 y bloquea a LEA-1, y el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente a MASP-2 y bloquea a LEA-2. Alternativamente, tal entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal bispecífico en el que un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente a MASP-3 y, por lo tanto, bloquea a LEA-1, y el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente a MASP-2 y bloquea a LEA-2. Una entidad de este tipo puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente tanto a MASP-1 como a MASP-3 y, por lo tanto, bloquea a LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente a MASP-2 y bloquea a LEA-2.

La composición inhibidora de la MASP 2 puede administrarse localmente al ojo, por ejemplo, por irrigación, inyección intravítrea o aplicación tópica de la composición en forma de gel, bálsamo o gotas. Alternativamente, el agente inhibidor de la MASP 2 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, por ejemplo, por vía intraarterial, intravenosa, intramuscular, por inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por vía oral para los agentes no

peptídergicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP 2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o biespecíficos o duales, o la administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de la AMD. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de la AMD.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o condiciones relacionadas con AP, como la AMD.

Por consiguiente, en una realización, la invención presente proporciona un método para tratar un sujeto que sufre de, o en riesgo para desarrollar AMD que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o fragmento de unión al antígeno del mismo, según lo revelado en el presente documento, el cual se une a MASP-3 humano e inhibe la activación de complementos de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de AMD en el sujeto. En una realización, la invención presente proporciona un método para tratar un sujeto que sufre de, o en riesgo para desarrollar AMD que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la ruta alternativa para tratar o reducir el riesgo de AMD en el sujeto, tal como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que incluya (i) VHCDR1 que incluya SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que incluya SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y (iii) VHCDR3 que incluya SEQ ID NO:88; y (b) una región variable de la cadena ligera que incluya: (i) VLCDR1 que incluya SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259, (ii) VLCDR2 que incluya SEQ ID NO:144 y iii) VLCDR3 que incluya SEQ ID NO:161.

C. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LESIONES POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES MASP-2

La isquemia tisular es la base de un amplio espectro de trastornos clínicos. Aunque la restauración oportuna del flujo sanguíneo es esencial para la preservación del tejido isquémico, se ha reconocido desde hace mucho tiempo que la reperfusión, que puede ocurrir de forma espontánea o por intervención terapéutica, puede conducir a una lesión tisular adicional, un fenómeno que se ha denominado lesión por isquemia reperfusión (I/R) lesión (Eltzschig, HK y Tobias, E., *Nat. Med*. 17: 1391-1401, 2011). La lesión por I/R puede afectar a órganos únicos, como el corazón (síndrome coronario agudo), el riñón (lesión renal aguda), el intestino (I/R intestinal) y el cerebro (apoplejía cerebrovascular). La lesión por I/R también puede afectar a múltiples órganos, como después de un traumatismo importante y reanimación (falla orgánica múltiple), paro circulatorio (lesión cerebral hipóxica, lesión renal aguda), enfermedad vascular periférica y anemia falciforme (síndrome de tórax agudo, lesión renal aguda). La cirugía mayor puede estar asociada con lesión por I/R, incluida la cirugía cardíaca (insuficiencia cardíaca aguda después de un bypass cardiopulmonar), cirugía torácica (lesión pulmonar aguda), cirugía vascular periférica (síndrome compartimental), cirugía vascular (lesión renal aguda) y trasplante de órgano sólido (rechazo agudo al injerto). Actualmente no hay terapias específicas dirigidas a la lesión por I/R y existe la necesidad de tratamientos efectivos para maximizar el rescate de tejido en la zona isquémica y mejorar el resultado funcional en estos entornos comunes.

La fisiopatología de la lesión por I/R es compleja y se caracteriza por una respuesta inflamatoria intensa después de la reperfusión. La activación del sistema del complemento se ha implicado como un componente importante de la lesión por I/R y la inhibición de la actividad del complemento ha sido eficaz en una variedad de modelos (Diepenhorst, GMP et al., Ann. Surg. 249: 889-899, 2009). La importancia relativa de las vías clásicas, de lectina y alternativas en la lesión por I/R es bastante inestable y puede diferir según los órganos afectados. Recientemente, la disponibilidad de ratones knockout deficientes en proteínas del complemento específicas e inhibidores específicos de la vía ha generado datos que implican a la lectina y vías alternativas en la lesión por I/R.

El papel de la vía alternativa en la lesión por I/R gastrointestinal se investigó utilizando ratones deficientes en factor D (-/-) y heterocigotos (+/-) (Stahl, GL, et al. *Am. J. Pathol.* 162:449-455, 2003). Tras la isquemia gastrointestinal transitoria, las lesiones intestinales y pulmonares se redujeron pero no se evitaron en ratones deficientes en factor D en comparación con los ratones heterocigotos, y la adición de factor D humano a los ratones con factor D (-/-) restauró la lesión por I/R. El mismo modelo se evaluó en ratones deficientes en C1q y deficientes en MBL-A/C y los

resultados mostraron que la lesión por I/R gastrointestinal fue independiente de la activación de la ruta clásica y de la C1q, pero que se requirió la activación de la vía de las lectinas y MBL para la lesión intestinal (Hart, ML, et al. *J. Immunol*. 174:6373-6380, 2005). A la inversa, la molécula de reconocimiento C1q de la vía clásica fue responsable de la lesión pulmonar después de la I/R intestinal (Hart, M.L., et al. *J. Immunol*. 174:6373-6380, 2005). Una hipótesis es que la activación del complemento durante la lesión por I/R se produce a través de la unión natural de IgM a los antígenos propios presentes en la superficie del tejido isquémico (pero no normal), por ejemplo, las cadenas pesadas de miosina no musculares tipo II. En un modelo de lesión por I/R gastrointestinal de ratón, los inmunocomplejos del tejido intestinal se evaluaron para determinar la presencia de factores iniciadores en las vías clásica (C1q), lectina (MBL) o alternativa (Factor B) (Lee, H., et al., Mol. Immunol. 47: 972-981, 2010). Los resultados mostraron que se detectaron C1q y MBL mientras que el Factor B no se detectó en estos inmunocomplejos, lo que indica la participación de las vías clásicas y de lectina, pero no la alternativa. En el mismo modelo, los ratones con deficiencia de Factor B no estaban protegidos de las lesiones locales en los tejidos, lo que brindaba apoyo adicional para la falta de participación de la vía alternativa. La función de la vía de las lectinas en la lesión gastrointestinal I/R se evaluó directamente en ratones deficientes en MASP-2 y los resultados mostraron que la lesión gastrointestinal se redujo en estos ratones en comparación con los controles de tipo ancho; el tratamiento con el anticuerpo monoclonal MASP-2 también fue protector (Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*. 108:7523-7528, 2011). En conjunto, estos resultados apoyan la participación de la vía de las lectinas en la lesión gastrointestinal I/R, con datos contradictorios con respecto a la participación de la vía alternativa.

En un modelo de un ratón con lesión por I/R miocardio, se demostró una función patógena para la vía de las lectinas, ya que los ratones deficientes en MBL estaban protegidos de la lesión de miocardio, mientras que los ratones deficientes en C1q y deficientes en C2/fB no lo estaban (Walsh, MC et al., *J. Immunol*. 175:541-546, 2005). La protección contra la lesión por I/R miocárdica también se observó en ratones deficientes en MASP-2 (Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl. Acad*. Sci. 108:7523-7528, 2011). El tratamiento de ratas en un modelo I/R de miocardio con anticuerpos monoclonales contra MBL de rata dio como resultado una reducción de la lesión por reperfusión post-isquémica (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413 18, 2001). En un estudio de pacientes con infarto de miocardio tratados con angioplastia, la deficiencia de MBL se asoció con una reducción de la mortalidad de 90 días en comparación con las contrapartes suficientes para MBL (M Trendelenburg et al., *Eur Heart* J. 31:1181, 2010). Además, los pacientes con infarto de miocardio

que desarrollan disfunción cardíaca después de la angioplastia tienen niveles de MBL aproximadamente tres veces más altos en comparación con los pacientes con recuperación funcional (Haahr-Pedersen S., et al., *J Inv Cardiology*, 21:13, 2009). Los anticuerpos de MBL también redujeron la deposición del complemento en las células endoteliales in vitro después del estrés oxidativo, lo que indica un papel para la vía de las lectinas en la lesión por I/R del miocardio (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol*. 156: 1549 56, 2000). En un modelo de un ratón con trasplante de corazón con isoinjerto heterotópico de lesión por I/R, se investigó la función de la vía alternativa utilizando la proteína de fusión específica de la vía CR2-fH (Atkinson, C., et al., *J. Immunol*. 185:7007- 7013, 2010). La administración sistémica de CR2-fH inmediatamente después del trasplante resultó en una reducción de la lesión por I/R miocárdica en un grado comparable al tratamiento con CR2-Crry, que inhibe todas las vías del complemento, lo que indica que la vía alternativa es de importancia clave en este modelo.

En un modelo de un ratón con lesión renal I/R, la ruta alternativa estaba implicada como ratones deficientes en factor B que estaban protegidos contra una disminución de la función renal y la lesión tubular, en comparación con ratones de tipo salvaje (Thurman, JM, et al., *J Immunol.* 170:1517-1523, 2003). El tratamiento con un anticuerpo monoclonal inhibidor contra el factor B impidió la activación del complemento y la reducción de murino en la lesión renal I/R (Thurman, J.M., et al., *J. Am. Soc. Nephrol*. 17:707-715, 2006). En un modelo de lesión renal I/R bilateral, los ratones deficientes en MBL-A/C se protegieron del daño renal en comparación con los ratones de tipo salvaje y la MBL humana recombinante revirtió el efecto protector en los ratones deficientes en MBL-A/C, lo que implica una función para MBL en este modelo (Moller-Kristensen, M., et al., *Scand. J. Immunol*. 61:426-434, 2005). En un modelo de una rata con lesión por I/R renal unilateral, la inhibición de MBL con un anticuerpo monoclonal para MBL-A conserva la función renal después de I/R (van der Pol, P., et al., *Am. J. Transplant*. 12:877 -887, 2010). Curiosamente, el papel de la MBL en este modelo no parece implicar la activación de los componentes del complemento terminal, ya que el tratamiento con un anticuerpo C5 no fue efectivo para prevenir la lesión renal. Más bien, la MBL parecía tener un efecto tóxico directo en las células tubulares, como las células tubulares proximales humanas incubadas con MBL in vitro, MBL internalizada con apoptosis celular posterior. En un modelo porcino de I/R renal, Castellano G. et al., (*Am J Pathol*, 176 (4): 1648-59, 2010), probaron un inhibidor de C1, que inactiva de forma irreversible las proteasas C1r y C1s en la vía clásica y también las proteasas MASP-1 y MASP-2 en complejos MBL de la vía de las lectinas, y encontraron que el inhibidor de C1 reducía la deposición del complemento en los capilares peritubulares y el glomérulo y reducía el daño tubular.

La vía alternativa parece estar involucrada en la lesión cerebral traumática experimental ya que los ratones deficientes en factor B tuvieron una activación sistémica reducida del complemento según lo medido por los niveles séricos de C5a y la muerte celular neuronal postraumática reducida en comparación con los ratones de tipo ancho (Leinhase, I., et al., *BMC Neurosci*. 7:55-67, 2006). En un accidente cerebrovascular humano, los componentes del complemento C1q, C3c y C4d se detectaron mediante tinción inmunohistoquímica en lesiones isquémicas, lo que sugiere la activación a través de la vía clásica (Pedersen, ED, et al., *Scand. J. Immunol.* 69:555-562, 2009). La selección de la vía clásica en modelos animales de isquemia cerebral ha dado resultados mixtos, con algunos estudios que demuestran protección, mientras que otros no muestran beneficios (Arumugam, T.V., et al., *Neuroscience* 158:1074-1089, 2009). Los estudios clínicos y experimentales han proporcionado pruebas sólidas de la participación de la vía de las lectinas. En los modelos de accidente cerebrovascular experimentales, la deficiencia de MBL o MASP-2 resulta en tamaños de infarto reducidos en comparación con los de ratones de tipo salvaje (Cervera A, et al.; *PLoS One* 3; 5(2): e8433, 2010; Osthoff M. et al., *PLoS One*, 6 (6): e21338, 2011). Además, los pacientes con accidente cerebrovascular con niveles bajos de MBL tienen un mejor pronóstico en comparación con su contraparte con MBL suficiente (Osthoff M. et al., *PLoS One*, 6 (6): e21338, 2011).

En un modelo de babuino con circulación extracorpórea, el tratamiento con un anticuerpo monoclonal factor D inhibió la inflamación sistémica según lo medido por los niveles plasmáticos de C3a, sC5b-9 e IL-6, y redujo la lesión tisular del miocardio, lo que indica la participación de la vía alternativa en este modelo. (Undar, A., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 74:355-362, 2002).

Por lo tanto, dependiendo del órgano afectado por la I/R, las tres vías del complemento pueden contribuir a la patogénesis y los resultados adversos. Según los hallazgos clínicos y experimentales detallados anteriormente, se espera que los inhibidores de la LEA-2 sean protectores en la mayoría de los entornos de I/R. La activación de LEA-1 dependiente de la lectina puede causar la activación del complemento a través de la vía alternativa al menos en algunos entornos. Además, la activación del complemento iniciada por LEA-2 puede amplificarse aún más mediante el bucle de amplificación de la vía alternativa y, por lo tanto, exacerbar la lesión tisular relacionada con I/R. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la LEA-1 proporcionen beneficios adicionales o complementarios al tratamiento en pacientes que padecen una afección relacionada con la isquemia.

En vista de lo anterior, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan beneficios terapéuticos independientes en el tratamiento, la prevención o la reducción

de la gravedad de las afecciones relacionadas con la reperfusión de isquemia. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr beneficios de tratamiento adicionales en comparación con cualquiera de los agentes. Un tratamiento óptimamente eficaz para una afección relacionada con I/R comprende, por lo tanto, ingredientes farmacéuticos activos que, solos o en combinación, bloquean tanto la LEA-1 como la LEA-2. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Preferentemente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede estar incluida en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico a MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de las lesiones por reperfusión de isquemia administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que incluye un agente inhibidor de MASP 1, un agente inhibidor de MASP 3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP 1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que experimenta reperfusión de isquemia. La composición inhibidora de MASP 1, MASP 3 o MASP 1/3 puede administrarse al sujeto mediante administración intra-arterial, intravenosa, intracraneal, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, y potencialmente por vía oral para inhibidores no peptidérgicos, y lo más adecuadamente posible administración intra-arterial o intravenosa. La administración de las composiciones inhibidoras de LEA-1 de la presente invención comienza de manera adecuada inmediatamente después o tan pronto como sea posible después de un evento de reperfusión de isquemia. En los casos en que la reperfusión se produce en un entorno controlado (por ejemplo, después de una reparación de aneurisma aórtico, trasplante de órganos o reinserción de miembros o dedos cortados o traumatizados), el agente inhibidor de la LEA-1 puede administrarse antes y/o durante y/o después de reperfusión. La administración puede repetirse periódicamente según lo determine un médico para lograr un efecto terapéutico óptimo.

En algunas realizaciones, los métodos se usan para tratar o prevenir una lesión por isquemia reperfusión asociada con al menos uno de reparación de aneurisma aórtico, circulación extracorpórea, reanastomosis vascular en relación con trasplantes de órganos y/o replantación de extremidades/dígitos, accidente

cerebrovascular, infarto de miocardio, y resucitación hemodinámica después de shock y/o procedimientos quirúrgicos.

En algunas realizaciones, los métodos se usan para tratar o prevenir una lesión por isquemia reperfusión en un sujeto que está a punto de sufrir, está sufriendo o se ha sometido a un trasplante de órganos. En algunas realizaciones, los métodos se usan para tratar o prevenir una lesión por isquemia reperfusión en un sujeto que está a punto de sufrir, está sufriendo o se ha sometido a un trasplante de órgano, siempre que el trasplante de órgano no sea un trasplante de riñón.

En una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 en un sujeto que experimenta reperfusión de isquemia, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP-1, MASP -3, o agente inhibidor de MASP-1/3 para el sujeto. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcionen un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de las lesiones por reperfusión de isquemia en comparación con la sola inhibición de LEA-1. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2.

La composición inhibidora de MASP 2 puede administrarse a un sujeto que la necesite mediante administración intra-arterial, intravenosa, intracraneal, intramuscular, subcutánea u otra parenteral, y potencialmente por vía oral para inhibidores no peptidérgicos, y más adecuadamente por administración intra-arterial

o intravenosa. La administración de las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención comienza de manera adecuada inmediatamente después o tan pronto como sea posible después de un evento de reperfusión de isquemia. En los casos en que la reperfusión se produce en un entorno controlado (por ejemplo, después de una reparación de aneurisma aórtico, trasplante de órganos o reinserción de miembros o dedos cortados o traumatizados), se puede administrar el agente inhibidor de MASP-2 antes y/o durante y/o después de reperfusión. La administración puede repetirse periódicamente según lo determine un médico para lograr un efecto terapéutico óptimo.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP 2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o agentes inhibidores biespecíficos o duales, o coadministración de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento o la prevención de lesiones por reperfusión de isquemia. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que experimenta reperfusión de isquemia.

Como se describe en los ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como en un sujeto que experimenta reperfusión de isquemia.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar reperfusión de isquemia que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de lesión tisular asociada con la reperfusión de isquemia en el sujeto.

D. LA FUNCIÓN DE LA MASP-3 EN LA ARTRITIS INFLAMATORIA Y NO INFLAMATORIA Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES MASP-2

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de las articulaciones sinoviales que también puede tener manifestaciones sistémicas. La AR afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial, y las mujeres son dos o tres veces más propensas a padecerla. La inflamación articular se manifiesta en hinchazón, dolor y rigidez. A medida que avanza la enfermedad, puede haber erosión y destrucción de las articulaciones, lo que resulta en un rango de movimiento y deformidades deterioradas. Los objetivos de tratamiento en la AR incluyen la prevención o el control del daño articular, la prevención de la pérdida de la función articular y la progresión de la enfermedad, el alivio de los síntomas y la mejora de la calidad de vida, y el logro de una remisión sin fármacos. El tratamiento farmacológico de la AR incluye medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés), analgésicos y agentes antiinflamatorios (glucocorticoides y medicamentos antiinflamatorios no esteroides). Los DMARD son el tratamiento más importante porque pueden inducir remisiones duraderas y retrasar o detener la progresión de la destrucción articular, que es irreversible. Los DMARD tradicionales incluyen moléculas pequeñas metotrexato, sulfasalazina, hidroxicloroquina, sales de oro, leflunomida, D-penicilamina, ciclosporina y azatioprina. Si los DMARD tradicionales no son adecuados para controlar la enfermedad, existen varias opciones de tratamiento, como los inhibidores del factor de necrosis tumoral (etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab), antagonistas de citoquinas (anakinra y tocilizumab), rituximab y abatacept.

Aunque la inmunidad adaptativa es claramente fundamental para la patogénesis de la AR como lo demuestra la asociación genética con los genes de activación de células T y la presencia de autoanticuerpos, también se han implicado mecanismos inmunitarios innatos (McInnes, IB y Schett, G. *New Engl.* J. Med. 365:2205-2219, 2011). En la AR humana, los niveles de líquido sinovial del fragmento de escisión de la vía alternativa Bb fueron varias veces más altos que en las muestras de pacientes con artritis inducida por cristales o enfermedad articular degenerativa, lo que implica una activación preferencial de la vía alternativa en pacientes con AR (Brodeur, JP, et al., *Arthritis Rheum*. 34:1531-1537, 1991). En el modelo experimental de transferencia pasiva de anticuerpos contra el colágeno II de la artritis, los ratones deficientes en factor B tuvieron una inflamación y daño articular disminuidos en comparación con los ratones de tipo salvaje, mientras que los ratones deficientes en C4 tuvieron una actividad de enfermedad similar a la de los ratones de tipo salvaje, lo que indica el requisito de la ruta alternativa y no la ruta clásica en este modelo (Banda, NK et al., *J. Immunol*. 177:1904-1912, 2006). En el mismo modelo experimental de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA), los

ratones con solo la vía clásica activa o solo la vía de las lectinas activa no fueron capaces de desarrollar artritis (Banda, NK et al., *Clin. Exp. Immunol*. 159:100-108, 2010). Los datos de este estudio sugirieron que la vía clásica o de las lectinas eran capaces de activar niveles bajos de C3 in vitro. Sin embargo, en ausencia del bucle de amplificación de la vía alternativa, el nivel de deposición conjunta de C3 fue inadecuado para producir una enfermedad clínica. Un paso clave en la activación de la ruta alternativa es la conversión del zimógeno del factor D (pro-factor D) a factor D maduro, que está mediado por MASP-1 y/o MASP-3 (Takahashi, M., et al., *J. Exp. Med*. 207:29-37, 2010) y/o HTRA1 (Stanton et al., Evidencia de que el Interactoma HTRA1 influye en la susceptibilidad a la degeneración macular relacionada con la edad, presentado en la conferencia de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología 2011 el 4 de mayo de 2011). La función de MASP-1/3 se evaluó en CAIA murino y los resultados mostraron que los ratones deficientes en MASP-1/3 estaban protegidos de la artritis en comparación con los ratones de tipo salvaje (Banda, NK, et al., *J. Immunol*. 185:5598-5606, 2010). En ratones deficientes en MASP-1/3, el pro-factor D pero no el factor D maduro se detectó en suero durante la evolución de CAIA, y la adición in vitro de factor D humano reconstituyó la activación de C3 y la generación de C5a usando sueros de estos ratones. Por el contrario, en un modelo murino de la fase efectora de la artritis, los ratones con deficiencia de C3 desarrollaron una artritis muy leve en comparación con los ratones WT, mientras que los ratones con deficiencia de factor B aún desarrollaron artritis, lo que indica una contribución independiente de las vías clásica/lectinas y alternativa (Hietala, MA et al., *Eur. J. Immunol.* 34:1208-1216, 2004). En el modelo K/BxN de ratón transgénico del receptor de células T de artritis inflamatoria, los ratones que carecen de C4 o C1q desarrollaron artritis similar a los ratones de tipo salvaje, mientras que los ratones que carecen de factor B o bien no desarrollaron artritis o tenían artritis leve, lo que demuestra el requisito de la vía alternativa y no la ruta clásica en este modelo (Ji H. et al., *Immunity* 16:157-168, 2002). En el modelo K/BxN, los ratones que carecen de MBL-A no estaban protegidos de la artritis inducida por el suero, pero como no se investigó el papel de la MBL-C, no se pudo eliminar un papel potencial para la vía de las lectinas (Ji et al., 2002, *supra*).

Dos grupos de investigación han propuesto de forma independiente que la activación del complemento dependiente de la lectina promueve la inflamación en pacientes con AR a través de la interacción de MBL con glicoformas IgG específicas (Malhotra et al., *Nat. Med*. 1:237 243, 1995; Cuchacovich et al., *J. Rheumatol.* 23:44 51, 1996). Se observa que las condiciones reumáticas están asociadas con un aumento marcado de las glicoformas de IgG que carecen de galactosa (denominadas glicoformas de IgG0) en la región Fc de la molécula (Rudd et al., *Trends*

Biotechnology 22:524 30, 2004). El porcentaje de glicoformas IgG0 aumenta con la progresión de la enfermedad de las afecciones reumáticas y vuelve a la normalidad cuando los pacientes entran en remisión. In vivo, la IgG0 se deposita en el tejido sinovial y la MBL está presente a niveles elevados en el líquido sinovial en individuos con AR. La agalactosil IgG agregada (IgG0) asociada con AR puede unirse a MBL y, por lo tanto, puede iniciar la activación del complemento dependiente de la lectina a través de LEA-1 y/o LEA-2. Además, los resultados de un estudio clínico que analiza las variantes alélicas de la MBL en pacientes con AR sugieren que la MBL puede tener una función inflamatoria en la enfermedad (Garred et al., *J. Rheumatol.* 27:26 34, 2000). Por lo tanto, la activación del complemento dependiente de la lectina a través de LEA-1 y/o LEA-2 puede jugar una función importante en la patogénesis de la AR.

La activación del complemento también tiene una función importante en la artritis reumatoide juvenil (Mollnes, T.E., et al., Arthritis Rheum. 29: 1359 64, 1986). Similar a la AR en adultos, en la artritis reumatoide juvenil, los niveles elevados de líquido sinovial y en suero del producto de activación del complemento de la vía alternativa Bb en comparación con C4d (un marcador para la activación clásica o LEA-2) indican que la activación del complemento está mediada predominantemente por LEA-1 (El Ghobarey, AF y otros, J. Rheumatology 7: 453 460, 1980; Agarwal, A., y otros, *Rheumatology* 39:189 192, 2000).

Asimismo, la activación del complemento tiene una función importante en la artritis psoriásica. Los pacientes con esta afección tienen un aumento de los productos de activación del complemento en su circulación, y sus glóbulos rojos parecen tener niveles más bajos del regulador del complemento CD59 (Triolo,. *Clin Exp Rheumatol*., 21 (2):225-8, 2003). Los niveles de complemento están asociados con la actividad de la enfermedad y tienen un alto valor predictivo para determinar los resultados del tratamiento (Chimenti at al., *Clin Exp Rheumatol.*, 30 (1): 23-30, 2012). De hecho, estudios recientes sugieren que el efecto de la terapia anti-TNF para esta condición es atribuible a la modulación del complemento (Ballanti et al*., Autoimmun Rev*., 10 (10): 617-23, 2011). Si bien no se ha determinado la función precisa del complemento en la artritis psoriásica, la presencia de productos de activación del complemento C4d y Bb en la circulación de estos pacientes sugiere un papel importante en la patogénesis. Sobre la base de los productos observados, se cree que LEA-1, y posiblemente también LEA-2 son responsables de la activación patológica del complemento en estos pacientes.

La osteoartritis (OA) es la forma más común de artritis y afecta a más de 25 millones de personas en los Estados Unidos. La OA se caracteriza por la descomposición y la eventual pérdida de cartílago articular, acompañada de

formación de hueso nuevo y proliferación sinovial, que lleva al dolor, rigidez, pérdida de la función articular y discapacidad. Las articulaciones que frecuentemente se ven afectadas por la OA son las manos, el cuello, la parte baja de la espalda, las rodillas y las caderas. La enfermedad es progresiva y los tratamientos actuales son para el alivio del dolor sintomático y no alteran la historia natural de la enfermedad. La patogénesis de la OA no está clara, pero se ha implicado una función para el complemento. En un análisis proteómico y transcriptómico del líquido sinovial de pacientes con OA, se expresaron anormalmente varios componentes del complemento en comparación con muestras de individuos sanos, incluidas las vías clásica (C1s y C4A) y alternativa (factor B), y también C3, C5, C7 y C9 (Wang, Q., et al., *Nat. Med*. 17:1674-1679, 2011). Además, en un modelo de un ratón de OA inducida por una meniscectomía media, los ratones deficientes en C5 tuvieron menos pérdida de cartílago, formación de osteofitos y sinovitis que los ratones positivos a C5, y el tratamiento de ratones de tipo salvaje con CR2-fH, una proteína de fusión que inhibe la vía alternativa, atenuó el desarrollo de la OA (Wang et al., 2011 *supra*).

El virus del río Ross (RRV) y el virus chikungunya (CHIKV) pertenecen a un grupo de virus transmitidos por mosquitos que pueden causar artritis aguda y persistente y miositis en los seres humanos. Además de causar enfermedades endémicas, estos virus pueden causar epidemias que involucran a millones de personas infectadas. Se cree que la artritis se inicia por la replicación viral y la inducción de la respuesta inflamatoria del receptor en la articulación y el sistema del complemento se ha invocado como un componente clave en este proceso. El líquido sinovial de humanos con poliartritis inducida por RRV contiene niveles más altos de C3a que el líquido sinovial de humanos con OA (Morrison, T.E., et al., *J. Virol*. 81:5132-5143, 2007). En un modelo de ratón con infección por RRV, los ratones deficientes en C3 desarrollaron artritis menos severa en comparación con los ratones de tipo salvaje, lo que implica el papel del complemento (Morrison et al., 2007, *supra*). Se investigó la vía específica del complemento involucrada y los ratones con vía de lectina inactivada (MBL-A-/- y MBL-C-/-) tuvieron artritis atenuada en comparación con los ratones de tipo salvaje. Por otro lado, los ratones con vía clásica inactivada (C1q -/-) o alternativa (factor B -/-) desarrollaron artritis severa, lo que indica que la vía de lectina iniciada por MBL tuvo una función esencial en este modelo (Gunn, BM, et al., *PLoS Pathog*. 8:e1002586, 2012). Debido a que las artritis involucran daños en las articulaciones, el daño articular inicial causado por varias etiologías puede desencadenar una onda secundaria de activación del complemento a través de LEA-2. En apoyo de este concepto, nuestro trabajo anterior ha demostrado que los ratones MASP-2 KO han reducido la lesión articular en

comparación con los ratones de tipo salvaje en el modelo de AR inducido por colágeno.

En vista del cuerpo de evidencia detallado anteriormente, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2, solos o en combinación, sean terapéuticamente útiles para el tratamiento de artritis. Por lo tanto, un tratamiento de eficacia óptima para las artritis puede comprender ingredientes farmacéuticos activos que, solos o en combinación, pueden bloquear tanto la LEA-1 como la LEA-2. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA2. Preferentemente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede estar incluida en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico a MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada unión el sitio puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2. De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de las artritis inflamatorias o no inflamatorias, incluida la osteoartritis, la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil y artritis psoriásica, administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que incluye un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP 1/3, en un portador farmacéutico a un sujeto que sufre de artritis inflamatoria o no inflamatoria, o en riesgo de desarrollarla. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP 1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra administración parenteral, o por administración oral. Por otra parte, la administración puede ser por aplicación local, tal como por inyección intra-articular. El agente inhibidor de LEA-1 puede administrarse periódicamente durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento o control de una afección crónica, o puede ser por administración única o repetida en el período anterior, durante y/o después de un traumatismo agudo o lesión, incluidos los procedimientos quirúrgicos realizados en la articulación.

En una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 en un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar artritis inflamatorias o no inflamatorias (incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil y artritis psoriásica), administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP1/3. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación

de agentes farmacológicos que bloqueen individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento o la prevención de las artritis en comparación con la inhibición de solo la LEA-1. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad de bloqueo de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad de bloqueo de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2.

La composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse al sujeto que lo necesite sistémicamente, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para inhibidores no peptidérgicos. Alternativamente, la administración puede ser por aplicación local, tal como por inyección intra-articular. El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse periódicamente durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento o control de una afección crónica, o puede ser por administración única o repetida en el período anterior, durante y/o después de un traumatismo agudo o lesión, incluidos los procedimientos quirúrgicos realizados en la articulación.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras opcionales de MASP 2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o agentes inhibidores biespecíficos o dobles, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de las artritis inflamatorias o no inflamatorias. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales

como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que padece artritis inflamatoria o no inflamatoria.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la artritis.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar artritis (artritis inflamatoria y no inflamatoria) que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que incluye anticuerpo de cantidad eficaz de un monoclonal de alta afinidad o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de artritis en el sujeto, tal como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o antígeno fragmento de unión del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que comprende SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y (iii) VHCDR3 que comprende SEQ ID NO:88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 que comprende SEQ ID NO:144 y (iii) VLCDR3 que comprende SEQ ID NO:161. En algunas realizaciones, el sujeto padece artritis, seleccionada del grupo que consiste en artrosis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, espondilitis anquilosante, enfermedad de Behcet, artritis relacionada con infecciones y artritis psoriásica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra sistémicamente (es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-arterial o inhalante). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra localmente a una articulación.

E. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA COAGULACIÓN INTRAVASCULAR DISEMINADA (DIC) Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES MASP-2

La coagulación intravascular diseminada (DIC) es un síndrome de sobreestimulación patológica del sistema de coagulación que puede manifestarse clínicamente como hemorragia y/o trombosis. La DIC no se presenta como una afección primaria, sino que se asocia con una variedad de procesos patológicos, como

daño tisular (traumatismo, quemaduras, insolación, reacción a la transfusión, rechazo agudo al trasplante), neoplasia, infecciones, trastornos obstétricos (placenta previa, embolia de líquido amniótico, toxemia del embarazo) y otras condiciones como shock cardiogénico, casi ahogamiento, embolia grasa, aneurisma aórtico. La trombocitopenia es una anomalía frecuente en pacientes en la unidad de cuidados intensivos, con una incidencia del 35% al 44%, y la DIC es la etiología en aproximadamente el 25% de estos casos, es decir, la DIC ocurre en aproximadamente el 10% de los pacientes críticos (Levi, M. y Opal, SM *Crit. Care* 10:222-231, 2006). La fisiopatología de la DIC es que el proceso de la enfermedad subyacente inicia una respuesta de coagulación fisiológica. Sin embargo, las sustancias protrombóticas superan los mecanismos de contrapeso normales, de modo que existe una deposición inadecuada de fibrina y plaquetas en la microcirculación, lo que conduce a isquemia de órganos, hipofibrinogenemia y trombocitopenia. El diagnóstico de DIC se basa en la presentación clínica en la enfermedad o proceso subyacente apropiado, junto con anomalías en los parámetros de laboratorio (tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial, productos de degradación de fibrina, dímero D o recuento de plaquetas). El tratamiento primario de DIC es tratar la condición subyacente que es el activador responsable. El soporte de productos sanguíneos en forma de glóbulos rojos, plaquetas, plasma fresco congelado y crioprecipitados puede ser necesario para tratar o prevenir complicaciones clínicas.

La función de las vías del complemento en DIC se ha investigado en varios estudios. La activación del complemento se evaluó en pacientes pediátricos con infección meningocócica comparando el curso clínico en relación con el genotipo MBL (Sprong, T. et al., *Clin. Infect. Dis.* 49:1380-1386, 2009). A su ingreso al hospital, los pacientes con deficiencia de MBL tenían niveles circulantes más bajos de C3bc, complejo del complemento terminal, C4bc y C3bBbP que los pacientes con suficiente MBL, lo que indica una menor extensión del complemento común, del complemento terminal y de la activación de la vía alternativa. Además, el grado de activación del complemento sistémico correlacionado con la gravedad de la enfermedad y los parámetros de DIC y los pacientes con deficiencia de MBL tuvieron un curso clínico más leve que los pacientes con suficiente MBL. Por lo tanto, aunque la deficiencia de MBL es un factor de riesgo para la susceptibilidad a las infecciones, la deficiencia de MBL durante el shock séptico puede estar asociada con un grado menor de la enfermedad.

Como se demuestra en los Ejemplos 1-4 de este documento, los estudios experimentales han resaltado la importante contribución de MBL y MASP-1/3 en la

respuesta inmune innata a Neisseria meningitidis, el agente etiológico de la infección meningocócica. Los sueros deficientes en MBL de ratones o humanos, los sueros humanos deficientes en MASP-3 o el ratón knockout MASP-1/3 son menos efectivos para activar el complemento y lisar meningococos in vitro en comparación con los sueros de tipo salvaje. De manera similar, los ratones knockout para MASP-1/3 son más susceptibles a la infección neissera que sus homólogos de tipo salvaje. Por lo tanto, en ausencia de inmunidad adaptativa, la vía LEA-1 contribuye a la resistencia innata del receptor a la infección neissera. A la inversa, LEA-1 aumenta la activación del complemento patológico que desencadena una respuesta dañina del receptor, incluida la DIC.

En un modelo murino de trombosis arterial, los ratones knockout con MBL-nulo y MASP-1/-3 tuvieron una disminución de la trombogénesis inducida por FeCl3 en comparación con los ratones de tipo salvaje o con los ratones con C2/factor B-nulo, y el defecto se reconstituyó con MBL humana recombinante (La Bonte, LR, et al., *J. Immunol*. 188:885-891, 2012). In Vitro, los sueros de ratón knockout MBL-nulo o MASP-1/-3 tuvieron una escisión reducida del sustrato de trombina en comparación con los sueros de ratón de tipo natural o de C2/factor B-nulo; la adición de MASP-1 humana recombinante restauró la escisión del sustrato de trombina en sueros de ratones knockout MASP-1/-3 (La Bonte et al., 2012, *supra*). Estos resultados indican que los complejos MBL/MASP, en particular MASP-1, desempeñan una función fundamental en la formación del trombo. Por lo tanto, la LEA-1 puede jugar una función importante en la trombosis patológica, incluida la DIC.

Los estudios experimentales han establecido un papel igualmente importante para la LEA-2 en la trombosis patológica. Además, los estudios in vitro demuestran que LEA-2 proporciona un enlace molecular entre el sistema del complemento y el sistema de coagulación. MASP-2 tiene actividad similar al factor Xa y activa la protrombina a través de la escisión para formar trombina, que posteriormente puede eliminar el fibrinógeno y promover la formación de coágulos de fibrina (ver también Krarup et al., *PLoS One*, 18:2(7):e623, 2007).

Estudios separados han demostrado que los complejos de lectina-MASP pueden promover la formación de coágulos, la deposición de fibrina y la liberación de fibrinopéptidos en un proceso dependiente de MASP-2 (Gulla et al., *Immunology*, 129(4):482-95, 2010). Por lo tanto, LEA-2 promueve la activación simultánea del complemento y el sistema de coagulación dependiente de la lectina.

Los estudios in vitro también han demostrado que MASP-1 tiene actividad similar a la trombina (Presanis JS, et al., *Mol Immunol*, 40(13):921-9, 2004), y

escinde el fibrinógeno y el factor XIII (Gulla KC et al., *Immunology*, 129(4):482-95, 2010), lo que sugiere que LEA-1 puede activar vías de coagulación de forma independiente o en combinación con LEA-2.

Los datos detallados anteriormente sugieren que LEA-1 y LEA-2 proporcionan enlaces independientes entre la activación del complemento dependiente de lectina y la coagulación. Por lo tanto, en vista de lo anterior, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan beneficios terapéuticos independientes en el tratamiento de un sujeto que padece coagulación intravascular diseminada. En algunas realizaciones, el sujeto sufre coagulación intravascular diseminada secundaria a sepsis, traumatismo, infección (bacteriana, viral, micótica, parasitaria), malignidad, rechazo al trasplante, reacción a transfusión, complicación obstétrica, aneurisma vascular, insuficiencia hepática, insolación, quemadura, exposición a la radiación, shock o reacción tóxica grave (por ejemplo, mordedura de serpiente, picadura de insecto, reacción a transfusión). En algunas realizaciones, el trauma es un trauma neurológico. En algunas realizaciones, la infección es una infección bacteriana, tal como una infección por Neisseria meningitidis.

Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una sola entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión se une y bloquea MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la coagulación intravascular diseminada en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una composición que consta de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que incluye un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP 3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que experimenta, o en riesgo de desarrollar, coagulación intravascular diseminada. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse

según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada. Para el tratamiento o la prevención de la DIC posterior a un traumatismo u otro evento agudo, la composición inhibidora de LEA-1 puede administrarse inmediatamente después de la lesión traumática o profilácticamente antes, durante, inmediatamente después, o dentro de uno a siete días o más, como dentro de las 24 horas a 72 horas, después de una lesión que induce un trauma o situaciones tales como cirugía en pacientes considerados en riesgo de DIC. En algunas realizaciones, la composición inhibidora de LEA-1 puede administrarse adecuadamente en una forma de dosificación de acción rápida, como por ejemplo la administración intravenosa o intra-arterial de un bolo de una solución que contiene la composición del agente inhibidor de LEA-1.

En una realización, el método según este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la coagulación intravascular diseminada en un sujeto que lo necesite, que incluye administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento o la prevención de la coagulación intravascular diseminada en comparación con la inhibición de solo la LEA-1. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-1 y bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede estar formada de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2.

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto que lo necesite sistemáticamente, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada. Para la DIC posterior a traumatismo u otro evento agudo, la composición inhibidora de MASP-2 se puede administrar inmediatamente después de la lesión traumática o profilácticamente antes, durante, inmediatamente después, o dentro de uno a siete días o más, como dentro de las 24 a 72 horas, después de una lesión que induce un trauma o situaciones como la cirugía en pacientes que se consideran en riesgo de DIC. En algunas realizaciones, la composición inhibidora de MASP-2 puede administrarse adecuadamente en una forma de dosificación de acción rápida, tal como por administración intravenosa o intra-arterial de un bolo de una solución que contiene la composición del agente inhibidor de MASP-2.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP-2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o biespecíficos o agentes de inhibición dual, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la coagulación intravascular diseminada en sujetos que lo necesiten. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que experimenta, o con riesgo de desarrollar coagulación intravascular diseminada.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la coagulación intravascular diseminada.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una coagulación intravascular diseminada que comprende una cantidad eficaz de un monoclonal de alta afinidad o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar coagulación intravascular diseminada, tal como, por ejemplo, en donde

dicho anticuerpo o antígeno fragmento de unión del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que comprende SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y (iii) VHCDR3 que comprende SEQ ID NO:88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 que comprende SEQ ID NO:144 y (iii) VLCDR3 que comprende SEQ ID NO:161.

F. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA (TMA), INCLUIDO EL SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO (HUS), SÍNDROME HEMOLÍTICO URÉMICO ATÍPICO (AHUS) Y PÚRPURA TROMBÓTICA TROMBOCITOPÉNICA (TTP) Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES MASP-2

La microangiopatía trombótica (TMA) se refiere a un grupo de trastornos caracterizados clínicamente por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e isquemia de órganos variables. Las características patológicas de la TMA son la activación de las plaquetas y la formación de microtrombos en las pequeñas arteriolas y vénulas. Las TMA clásicas son el síndrome hemolítico urémico (HUS) y la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). HUS se distingue de TTP por la presencia de insuficiencia renal aguda. HUS se presenta en dos formas: diarrea asociada (D+) o HUS típica, y diarrea negativa (D-) o HUS atípica (aHUS).

HUS

D + HUS se asocia con una enfermedad diarreica prodrómica causada generalmente por Escherichia coli O157 u otra cepa bacteriana que produce toxina Shiga, representa más del 90% de los casos de HUS en niños y es la causa más común de insuficiencia renal aguda en niños. Aunque la infección humana por Escherichia coli O157 es relativamente frecuente, los porcentajes de diarrea sanguinolenta que progresa a D+HUS varian de 3% a 7% en casos esporádicos y de 20% a 30% en algunos brotes (Zheng, XL y Sadler, JE, Annu. Rev. Pathol. 3:249-277, 2008). HUS generalmente ocurre de 4 a 6 días después del inicio de la diarrea y aproximadamente dos tercios de los niños requieren diálisis en la fase aguda de la enfermedad. El tratamiento de D+HUS es de apoyo ya que no se ha demostrado que tratamientos específicos sean efectivos. El pronóstico de D+HUS es favorable y la mayoría de los pacientes recuperan la función renal.

La patogénesis de D+HUS implica toxinas Shiga producidas por bacterias que se unen a las membranas en células endoteliales microvasculares, monocitos y plaquetas. La microvasculatura del riñón es la más afectada. Después de la unión, la

toxina se internaliza, lo que lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios y la muerte celular final. Se cree que el daño de las células endoteliales desencadena la trombosis microvascular renal al promover la activación de la cascada de coagulación. Hay evidencia de la activación del sistema del complemento en D+HUS. En niños con D+HUS, los niveles plasmáticos de Bb y SC5b-9 aumentaron en el momento de la hospitalización en comparación con los controles normales y, en el día 28 después del alta hospitalaria, los niveles plasmáticos se normalizaron (Thurman, JM et al., Clin. *J. Am. Soc. Nephrol*. 4:1920-1924, 2009). Se encontró que la toxina 2 de Shiga (Stx2) activaba el complemento humano en la fase líquida in vitro, predominantemente a través de la vía alternativa, ya que la activación procedía en presencia de ácido etilenglicol tetraacético que bloquea la vía clásica (Orth, D. et al., *J Immunol.* 182:6394-6400, 2009). Además, Stx2 se unió al factor H y no al factor I, y retrasó la actividad del cofactor del factor H en las superficies celulares (Orth et al, 2009, *supra*). Estos resultados sugieren que la toxina Shiga puede causar daño renal a través de múltiples mecanismos potenciales, incluido un efecto tóxico directo, e indirectamente a través de la activación del complemento o la inhibición de los reguladores del complemento. Se espera que los efectos tóxicos en el endotelio vascular activen el complemento a través de LEA-2, como lo demuestra la efectividad del bloqueo de MASP-2 para prevenir la lesión por reperfusión mediada por el complemento en diversos lechos vasculares como se describe en Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl Acad Sci*. 108:7523-7528, 2011.

En un modelo murino de HUS inducido por co-inyección de toxina Shiga y lipopolisacárido, los ratones deficientes en factor B tenían menos trombocitopenia y estaban protegidos de la insuficiencia renal en comparación con los ratones de tipo salvaje, lo que implica la activación de la vía alternativa dependiente de LEA-1 en trombosis microvascular (Morigi, M. et al., *J. Immunol*. 187:172-180, 2011). Como se describe en el presente documento, en el mismo modelo, la administración del anticuerpo MASP-2 también fue efectiva y aumentó la supervivencia después de la exposición a STX, lo que implica la vía del complemento dependiente de LEA-2 en la trombosis microvascular.

En base a lo anterior, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan un beneficio terapéutico independiente en el tratamiento o la prevención de HUS. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente

bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada uno el sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

aHUS

El HUS atípico (aHUS) es una enfermedad rara, con una incidencia estimada de 2 por millón en los Estados Unidos (Loirat, C. y Fremeaux-Bacchi, V. Orphanet *J. Rare Dis*. 6:60-90, 2011). El HUS atípico puede desarrollarse a cualquier edad, aunque la mayoría de los pacientes tienen un inicio durante la infancia. El HUS atípico es heterogéneo: algunos casos son familiares, algunos son recurrentes y otros son desencadenados por una enfermedad infecciosa, típicamente el tracto respiratorio superior o gastroenteritis. El inicio de aHUS suele ser repentino y la mayoría de los pacientes requieren diálisis al ingreso. Las manifestaciones extra renales están presentes en aproximadamente el 20% de los pacientes y pueden afectar al sistema nervioso central, infarto de miocardio, gangrena isquémica distal o insuficiencia multiorgánica. El tratamiento del aHUS incluye la atención de apoyo para la disfunción orgánica, la infusión de plasma o el intercambio de plasma, y el eculizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al C5 que recientemente se aprobó para su uso en los Estados Unidos y la Unión Europea. El pronóstico en aHUS no es tan bueno como en D+HUS, con una mortalidad de aproximadamente el 25% durante la etapa aguda y la mayoría de los sobrevivientes desarrollan enfermedad renal en etapa terminal.

El HUS atípico se ha caracterizado como una enfermedad de desregulación del complemento en que aproximadamente el 50% de los pacientes tienen mutaciones en los genes que codifican proteínas reguladoras del complemento (Zheng y Sadler, 2008 *supra*). La mayoría de las mutaciones se ven en el factor H (FH); otras mutaciones incluyen proteína de cofactor de membrana (PCM), factor I (FI), factor B y C3. Los estudios funcionales mostraron que las mutaciones en FH, PCM y FI conducen a la pérdida de la función y, por lo tanto, a una mayor activación del complemento, mientras que las mutaciones en el factor B son ganancia de función. Los efectos de estas mutaciones afectan predominantemente a la vía alternativa. Estas anomalías genéticas son factores de riesgo en lugar de ser la única causa de enfermedad, ya que aproximadamente el 50% de los miembros de la familia que portan la mutación no presentan la enfermedad a los 45 años (Loirat y Fremeaux-Bacchi, 2011 *supra*).

El factor H es una proteína de control del complemento que protege el tejido receptor del ataque del complemento de la vía alternativa. FH regula el bucle de amplificación de la ruta alternativa de tres maneras: es un cofactor para FI, que corta C3b, inhibe la formación de la ruta alternativa C3 convertasa, C3bBb, y se une a los polianiones en las superficies celulares y matrices de tejidos y la deposición de bloques de C3b (Atkinson, JP y Goodship, THJ, J. Exp. Med. 6:1245-1248, 2007). La mayoría de las mutaciones de FH en pacientes con aHUS se producen en los dominios de repetición de consenso corto C-terminal de la proteína, que dan como resultado una unión defectuosa de FH a heparina, C3b y endotelio, pero no altera la regulación de C3 en plasma que reside entre los dominios N-terminales (Pickering, MC et al., J. *Exp. Med*. 204:1249-1256, 2007). Los ratones deficientes en FH tienen activación descontrolada de C3 en plasma y desarrollan espontáneamente glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II, pero no aHUS. Sin embargo, los ratones deficientes en FH que expresaron transgénicamente una proteína FH de ratón funcionalmente equivalente a los mutantes FH humanos asociados con un HUS desarrollan espontáneamente un HUS pero no una glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II, lo que proporciona evidencia in vivo de que un control defectuoso de la activación de una vía alternativa en el endotelio renal es una clave evento en la patogenia del aHUS asociado a FH (Pickering et al., 2007 *supra*). Otra forma de aHUS asociado a FH ocurre en pacientes que tienen autoanticuerpos anti-FH que resultan en una pérdida de la actividad funcional de FH; la mayoría de estos pacientes tienen supresiones en genes que codifican cinco proteínas relacionadas con FH (Loirat y Fremeaux-Bacchi, 2011, *supra*).

Similar a la FH, la MCP inhibe la activación del complemento regulando la deposición de C3b en las células diana. Las mutaciones de MCP dan como resultado proteínas con una baja unión de C3b y actividad de cofactor, lo que permite la activación de la vía alternativa desregulada. FI es una serina proteasa que escinde C3b y C4b en presencia de cofactores, como FH y MCP, y por lo tanto previene la formación de convertasas C3 y C5 e inhibe tanto la alternativa como las vías del complemento clásicas. La mayoría de las mutaciones de aHUS asociadas a FI resultan en una actividad de FI reducida para la degradación de C3b y C4b (Zheng y Stadler, 2008, supra). FB es un zimógeno que transporta los sitios catalíticos de la ruta alternativa convertasa C3bBb. El análisis funcional mostró que las mutaciones FB asociadas a aHUS provocan un aumento de la activación de la vía alternativa (Loirat y Fremeaux-Bacchi, 2011, supra). Las mutaciones heterocigotas en C3 están asociadas con aHUS. La mayoría de las mutaciones en C3 inducen un defecto de C3 para unirse a MCP, lo que lleva a una mayor capacidad de FB para unirse a C3b y una mayor formación de convertasa C3 (Loirat y Fremeaux-Bacchi, 2011, *supra*). Por

lo tanto, aHUS es una enfermedad estrechamente asociada con mutaciones en los genes del complemento que conducen a un control inadecuado del bucle de amplificación de la vía alternativa. Dado que el bucle de amplificación de la ruta alternativa depende de la actividad proteolítica del factor B, y dado que LEA-1 se requiere para la activación del factor B (ya sea por escisión dependiente de MASP-3 o por escisión mediada por factor D en la que la MASP-1 contribuye a la maduración de factor D), se espera que los agentes bloqueadores de LEA-1 prevengan la activación incontrolada del complemento en individuos susceptibles. Como resultado, se espera que los agentes bloqueadores de LEA-1 traten efectivamente aHUS.

Si bien la función central de un bucle de amplificación de la vía alternativa desregulada en aHUS es ampliamente aceptada, los desencadenantes que inician la activación del complemento y las vías moleculares involucradas están pendientes. No todos los individuos portadores de las mutaciones descritas anteriormente desarrollan aHUS. De hecho, los estudios familiares han sugerido que la penetrancia de aHUS es solo de ~50% (Sullivan M. et al., *Ann Hum Genet* 74:17-26 2010). La historia natural de la enfermedad sugiere que aHUS se desarrolla con mayor frecuencia después de un evento de iniciación, como un episodio infeccioso o una lesión. Los agentes infecciosos son bien conocidos por activar el sistema del complemento. En ausencia de una inmunidad adaptativa preexistente, la activación del complemento por agentes infecciosos puede iniciarse principalmente a través de LEA-1 o LEA-2. Por lo tanto, la activación del complemento dependiente de la lectina desencadenada por una infección puede representar el desencadenante para la posterior amplificación patológica de la activación del complemento en individuos predispuestos a HUS, lo que en última instancia puede conducir a la progresión de la enfermedad. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención comprende tratar a un paciente que padece aHUS secundario a una infección administrando una cantidad eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 o LEA-2.

Otras formas de lesión en el tejido receptor activarán el complemento a través de LEA-2, en particular la lesión del endotelio vascular. Las células endoteliales vasculares humanas sometidas a estrés oxidativo, por ejemplo, responden expresando residuos superficiales que se unen a las lectinas y activan la vía LEA-2 del complemento (Collard et al., *Am J. Pathol* 156(5):1549-56, 2000). La lesión vascular después de isquemia / reperfusión también activa el complemento a través de LEA-2 *in vivo* (Moller-Kristensen et al., *Scand J Immunol* 61(5):426-34, 2005). La activación de la vía de lectina en este contexto tiene consecuencias patológicas para el huésped, y como se muestra en los Ejemplos 22 y 23, la inhibición de la LEA-2 al

bloquear el MASP-2 previene una mayor lesión del tejido del huésped y resultados adversos (ver también Schwaeble PNAS, 2011, *supra*).

Por lo tanto, también se sabe que otros procesos que provocan aHUS activan LEA-1 o LEA-2. Por lo tanto, es probable que la vía LEA-1 y/o LEA-2 pueda representar el mecanismo de activación del complemento inicial que se amplifique de manera inapropiada de manera desregulada en individuos genéticamente predispuestos a aHUS, iniciando así la patogénesis de HUS. Por deducción, se espera que los agentes que bloquean la activación del complemento a través de LEA-1 y/o LEA-2 prevengan la progresión de la enfermedad o reduzcan las exacerbaciones en individuos susceptibles a aHUS.

Como apoyo adicional a este concepto, estudios recientes han identificado a Streptococcus-pneumoniae como un agente etiológico importante en casos pediátricos de aHUS. (Lee, C.S. et al, *Nephrology*, 17(1):48-52 (2012); Banerjee R. et al., *Pediatr Infect Dis J.,* 30 (9):736-9 (2011)). Esta etiología particular parece tener un pronóstico desfavorable, con una mortalidad significativa y una morbilidad a largo plazo. En particular, estos casos involucraron infecciones no entéricas que dieron lugar a manifestaciones de microangiopatía, uremia y hemólisis sin evidencia de mutaciones concurrentes en los genes del complemento que se sabe que predisponen al aHUS. Es importante tener en cuenta que S. pneumoniae es particularmente eficaz para activar el complemento, y lo hace predominantemente a través de LEA-2. Por lo tanto, en casos de HUS no entérica asociada con infección neumocócica, se espera que las manifestaciones de microangiopatía, uremia y hemólisis sean impulsadas predominantemente por la activación de LEA-2, y se esperan agentes que bloqueen LEA-2, incluidos los anticuerpos MASP-2 para prevenir la progresión de aHUS o reducir la gravedad de la enfermedad en estos pacientes. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención comprende tratar a un paciente que padece aHUS no entérico que está asociado con la infección por S. pneumoniae mediante la administración de una cantidad eficaz de un agente inhibidor de MASP-2.

TTP

La púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) es un trastorno potencialmente mortal del sistema de coagulación de la sangre causado por disfunciones autoinmunes o hereditarias que activan la cascada de coagulación o el sistema del complemento (George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35, 2006). Esto da lugar a numerosos coágulos microscópicos, o trombosis, en pequeños vasos sanguíneos en todo el cuerpo, que es un rasgo característico de las TMA. Los glóbulos

rojos están sujetos a tensión por cizallamiento, que daña sus membranas, lo que lleva a la hemólisis intravascular. La consiguiente reducción del flujo sanguíneo y la lesión endotelial dañan los órganos, incluidos el cerebro, el corazón y los riñones. La TTP se caracteriza clínicamente por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, cambios neurológicos, insuficiencia renal y fiebre. En el periodo anterior al intercambio de plasma, la tasa de mortalidad fue del 90% durante los episodios agudos. Incluso con el intercambio de plasma, la supervivencia a los seis meses es aproximadamente del 80%.

La TTP puede surgir de la inhibición genética o adquirida de la enzima ADAMTS-13, una metaloproteasa responsable de dividir grandes multímeros del factor de von Willebrand (vWF) en unidades más pequeñas. La inhibición o deficiencia de ADAMTS-13 finalmente resulta en un aumento de la coagulación (Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14:1072-1081, 2003). ADAMTS-13 regula la actividad de vWF; en ausencia de ADAMTS-13, el vWF forma multímeros grandes que tienen más probabilidades de unir las plaquetas y predispone a los pacientes a la agregación de plaquetas y la trombosis en la microvasculatura.

Se han identificado numerosas mutaciones en ADAMTS13 en individuos con TTP. La enfermedad también puede desarrollarse debido a autoanticuerpos contra ADAMTS-13. Además, la TTP puede desarrollarse durante el cáncer de mama, tracto gastrointestinal o próstata (George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14, 2011), embarazo (segundo trimestre o posparto), (George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344, 2003), o se asocia con enfermedades, como el VIH o enfermedades autoinmunes como el lupus eritematosis sistémico (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol*. 22:355-8, 2003). La TTP también puede ser causada por ciertos tratamientos farmacológicos, que incluyen heparina, quinina, ingrediente inmune, agentes quimioterapéuticos para el cáncer (bleomicina, cisplatino, citosina arabinosida, daunomicina gemcitabina, mitomicina C y tamoxifeno), ciclosporina A, anticonceptivos, penicilina, rifampina y fármacos antiplaquetarios que incluyen ticlopidina y clopidogrel (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci.,* 16: 353–357, 2011). Otros factores o afecciones asociadas con la TTP son toxinas como venenos de abejas, sepsis, secuestro esplénico, trasplante, vasculitis, cirugía vascular e infecciones como Streptococcus pneumoniae y citomegalovirus (Moake JL., *N Engl J Med*., 347:589–600, 2002). La TTP debida a una deficiencia transitoria funcional de ADAMTS-13 puede ocurrir como consecuencia de una lesión de las células endoteliales asociada con la infección por S. pneumoniae (*Pediatr Nephrol*, 26: 631-5, 2011).

El intercambio de plasma es el tratamiento estándar para la TTP (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397, 1991). El intercambio de plasma reemplaza la

actividad ADAMTS-13 en pacientes con defectos genéticos y elimina los autoanticuerpos ADAMTS-13 en aquellos pacientes con TTP autoinmune adquirida (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am*., 21(4):609–v, 2007). Los agentes adicionales, como los medicamentos inmunosupresores, se agregan rutinariamente a la terapia (George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35, 2006). Sin embargo, el intercambio de plasma no es exitoso para aproximadamente el 20% de los pacientes, la recaída ocurre en más de un tercio de los pacientes y la plasmaféresis es costosa y técnicamente exigente. Además, muchos pacientes son incapaces de tolerar el intercambio de plasma. En consecuencia, sigue existiendo una necesidad crítica de tratamientos adicionales y mejores para la TTP.

Debido a que la TTP es un trastorno de la cascada de coagulación de la sangre, el tratamiento con antagonistas del sistema del complemento puede ayudar a estabilizar y corregir la enfermedad. Si bien la activación patológica de la vía alternativa del complemento está vinculada a aHUS, la función de la activación del complemento en TTP es menos claro. La deficiencia funcional de ADAMTS13 es importante para la susceptibilidad a la TTP, sin embargo, no es suficiente para causar episodios agudos. Los factores ambientales y/u otras variaciones genéticas pueden contribuir a la manifestación de TTP. Por ejemplo, los genes que codifican proteínas involucradas en la regulación de la cascada de coagulación, vWF, función plaquetaria, componentes de la superficie del vaso endotelial o sistema del complemento pueden estar implicados en el desarrollo de microangiopatía trombótica aguda (Galbusera, M. et al., *Haematologica*, 94: 166–170, 2009). En particular, se ha demostrado que la activación del complemento desempeña una función fundamental; se ha comprobado que el suero de la microangiopatía trombótica asociada con la deficiencia de ADAMTS-13 causa el depósito de C3 y MAC y la subsiguiente activación de los neutrófilos, que podría ser abrogada por la inactivación del complemento (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52, 2005). Además, recientemente se ha demostrado que durante los episodios agudos de TTP hay niveles aumentados de C4d, C3bBbP y C3a (M. Réti et al., *J. Thromb Haemost*. 10(5):791-798, 2012), consistente con activación de las vías clásicas, lectinas y alternativas. Este aumento en la cantidad de activación del complemento en los episodios agudos puede iniciar la activación de la vía terminal y ser responsable de la exacerbación adicional de la TTP.

La función de ADAMTS-13 y vWF en TTP es claramente responsable de la activación y agregación de las plaquetas y su función posterior en la tensión de cizallamiento y la deposición en microangiopatías. Las plaquetas activadas interactúan y activan las vías de complemento tanto clásicas como alternativas. La

activación del complemento mediada por plaquetas aumenta los mediadores inflamatorios C3a y C5a (Peerschke E. et al., *Mol Immunol,* 47:2170-5 (2010)). Las plaquetas pueden por lo tanto servir como objetivos de la activación clásica del complemento en TTP heredada o autoinmune.

Como se describió anteriormente, la activación del complemento dependiente de la lectina, en virtud de la actividad similar a la trombina de MASP-1 y la activación de protombina mediada por LEA-2, es la vía molecular dominante que vincula la lesión endotelial a la coagulación y la trombosis microvascular que se produce en HUS. De manera similar, la activación de LEA-1 y LEA-2 puede impulsar directamente el sistema de coagulación en TTP. La activación de las vías de LEA-1 y LEA-2 puede iniciarse en respuesta a la lesión inicial del endotelio causada por la deficiencia de ADAMTS-13 en TTP. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2, incluidos, entre otros, los anticuerpos que bloquean la función MASP-2, la función MASP-1, la función MASP-3 o la función MASP-1 y MASP-3 mitigarán las microangiopatías asociadas con la coagulación microvascular, la trombosis y la hemólisis en pacientes que sufren de TTP.

Los pacientes que sufren de TTP suelen presentarse en la sala de emergencias con uno o más de los siguientes: púrpura, insuficiencia renal, plaquetas bajas, anemia y/o trombosis, incluido el accidente cerebrovascular. El estándar actual de atención para la TTP incluye la administración intra-catéter (por ejemplo, una forma intravenosa u otra forma de catéter) de plasmaféresis de reemplazo por un período de dos semanas o más, generalmente tres veces por semana, pero hasta por día. Si el sujeto da positivo por la presencia de un inhibidor de ADAMTS13 (es decir, un anticuerpo endógeno contra ADAMTS13), entonces la plasmaféresis se puede llevar a cabo en combinación con una terapia inmunosupresora (por ejemplo, corticosteroides, rituxan o ciclosporina). Los sujetos con TTP refractaria (aproximadamente el 20% de los pacientes con TTP) no responden a al menos dos semanas de terapia con plasmaféresis.

De acuerdo con lo anterior, en una realización, en el contexto de un diagnóstico inicial de TTP, o en un sujeto que muestra uno o más síntomas compatibles con un diagnóstico de TTP (por ejemplo, el compromiso del sistema nervioso central, trombocitopenia grave (un recuento plaquetario de menor o igual a 5000/μL si está fuera de la aspirina, menor o igual a 20,000/μL si está en la aspirina, compromiso cardíaco grave, compromiso pulmonar grave, infarto gastrointestinal o gangrena, se proporciona un método para tratar al sujeto con una cantidad efectiva de un agente inhibidor de LEA-2 (por ejemplo, un anticuerpo MASP-2) o un agente inhibidor de LEA-1 (por ejemplo, un anticuerpo MASP-1 o MASP-3) como terapia de

primera línea en ausencia de plasmaféresis, o en combinación con plasmaféresis. Como terapia de primera línea, el agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral. En algunas realizaciones, el agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 se administra a un sujeto como una terapia de primera línea en ausencia de plasmaféresis para evitar las posibles complicaciones de la plasmaféresis, como hemorragia, infección y exposición a trastornos y/o alergias inherentes al donante de plasma, o en un sujeto con aversión a la plasmaféresis, o en un entorno donde la plasmaféresis no está disponible. En algunas realizaciones, el agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 se administra al sujeto que padece TTP en combinación (incluida la administración conjunta) con un agente inmunosupresor (por ejemplo, corticosteroides, rituxan o ciclosporina) y/o en combinación con ADAMTS-13 concentrado.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar un agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 a un sujeto que padece TTP a través de un catéter (por ejemplo, por vía intravenosa) durante un primer período de tiempo (por ejemplo, una fase aguda que dura al menos un día hasta una semana o dos semanas) seguido de la administración subcutánea de un agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 al sujeto durante un segundo período de tiempo (por ejemplo, una fase crónica de al menos dos semanas o más). En algunas realizaciones, la administración en el primer y/o segundo período de tiempo ocurre en ausencia de plasmaféresis. En algunas realizaciones, el método se usa para mantener al sujeto para evitar que el sujeto sufra uno o más síntomas asociados con la TTP.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre TTP refractario (es decir, un sujeto que no ha respondido a al menos dos semanas de terapia con plasmaféresis), administrando una cantidad de un inhibidor eficaz LEA-1 y/o LEA-2 para reducir uno o más síntomas de TTP. En una realización, el inhibidor LEA-1 y/o LEA-2 se administran a un sujeto con TTP refractario en forma crónica, durante un período de tiempo de al menos dos semanas o más a través de la administración subcutánea u otra administración parenteral. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En algunas realizaciones, el método comprende además determinar el nivel de al menos un factor de complemento (por ejemplo, C3, C5) en el sujeto antes del tratamiento, y opcionalmente durante el tratamiento, en donde la determinación de un nivel reducido de al menos un factor de complemento en comparación con un

valor estándar o un sujeto control sano es indicativo de la necesidad de un tratamiento continuado con el agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar, por vía subcutánea o intravenosa, un agente inhibidor de LEA-1 y/o LEA-2 a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar TTP. El tratamiento es preferiblemente diario, pero puede ser tan infrecuente como mensual. El tratamiento continúa hasta que el recuento de plaquetas del sujeto es superior a 150,000/ml durante al menos dos días consecutivos.

En resumen, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan un beneficio terapéutico independiente en el tratamiento de las TMA, incluyendo HUS, aHUS y TTP. Además, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 usados juntos logren un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes que sufren formas variantes de TMA. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una sola entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión se pueda unir a y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una microangiopatía trombótica como el síndrome hemolítico urémico (HUS), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que incluye un agente inhibidor de MASP 1, un agente inhibidor de MASP 3 o una combinación de un agente inhibidor de MASP 1/3 , en un portador farmacéutico a un sujeto que padece, o en riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica. La composición inhibidora de MASP 1, MASP 3 o MASP 1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una microangiopatía trombótica como el síndrome hemolítico urémico (HUS), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 a un sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloqueen individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de una microangiopatía trombótica en comparación con la inhibición de solo la LEA-1. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP 2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una

composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o biespecíficos o agentes inhibidores duales, o la administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una microangiopatía trombótica en un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como una microangiopatía trombótica (por ejemplo el síndrome hemolítico urémico (HUS), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o púrpura trombótica trombocitopénica (TTP)).

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica (por ejemplo el síndrome hemolítico urémico (HUS), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o púrpura trombótica trombocitopénica (TTP)) que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la ruta alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una microangiopatía trombótica (por ejemplo el síndrome hemolítico urémico (HUS), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o púrpura trombótica trombocitopénica (TTP) o TMA relacionada con el trasplante (TA-TMA), tal como, por ejemplo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 que comprende SEQ ID NO:86 o SEQ ID NO:275 y (iii) VHCDR3 que comprende SEQ ID NO:88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 o SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 que comprende SEQ ID NO:144 y (iii) VLCDR3 que comprende SEQ ID NO:161.

G. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN EL ASMA Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON AGENTES INHIBIDORES MASP-2

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica común de las vías respiratorias. Aproximadamente 25 millones de personas en los Estados Unidos tienen asma, incluidos siete millones de niños menores de 18 años, y más de la mitad sufre al menos un ataque de asma cada año, lo que genera más de 1.7 millones de visitas al departamento de emergencia y 450,000 hospitalizaciones por año (world-wide-web en gov/health/prof/lung/ashma/naci/ashma-info/index.htm., consultado el 4 de mayo de 2012). La enfermedad es heterogénea con múltiples fenotipos clínicos. El fenotipo más común es el asma alérgica. Otros fenotipos incluyen asma no alérgica, enfermedad respiratoria exacerbada con aspirina, asma postinfecciosa, asma ocupacional, asma inducida por irritantes por inhalación y asma inducida por el ejercicio. Las características cardinales del asma alérgica incluyen hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR por sus siglas en inglés) a una variedad de estímulos específicos e inespecíficos, producción excesiva de moco en las vías respiratorias, eosinofilia pulmonar y concentración elevada de IgE sérica. Los síntomas del asma incluyen tos, sibilancias, opresión en el pecho y dificultad para respirar. El objetivo del tratamiento del asma es controlar la enfermedad y minimizar las exacerbaciones, los síntomas diarios y permitir que los pacientes sean físicamente activos. Las pautas de tratamiento actuales recomiendan tratamientos escalonados hasta que se logre el control del asma. El primer paso del tratamiento es según sea necesario el agonista β2 inhalado de acción rápida, seguido de la adición de medicamentos controladores como los corticosteroides inhalados, los agonistas β2 inhalados de acción prolongada, los medicamentos modificadores de leucotrienos, la teofilina, los glucocorticosteroides orales y el anticuerpo monoclonal anti-IgE.

Aunque el asma es de origen multifactorial, en general se acepta que surge como resultado de respuestas inmunológicas inapropiadas a antígenos ambientales comunes en individuos genéticamente susceptibles. El asma se asocia con la activación del complemento y las anafilatoxinas (AT) C3a y C5a tienen propiedades proinflamatorias e inmunorreguladoras que son relevantes para el desarrollo y la modulación de la respuesta alérgica (Zhang, X. y Kohl, J. Expert. Rev. *Clin. Immunol*. , 6:269-277, 2010). Sin embargo, la participación relativa de la vía clásica, alternativa y de lectinas del complemento en el asma no se conoce bien. La vía alternativa puede activarse en la superficie de los alérgenos y la vía de las lectinas puede activarse mediante el reconocimiento de estructuras de polisacáridos alérgenos, ambos procesos conducen a la generación de TA. El complemento puede ser activado por diferentes vías dependiendo del alérgeno causante involucrado. El polen de gramíneas altamente alérgico de la familia Parietaria, por ejemplo, es muy eficaz para promover la activación de C4 dependiente de MBL, lo que implica a LEA-2. Por el contrario, el alérgeno de los ácaros del polvo doméstico no requiere MBL

para la activación del complemento (Varga et al. *Mol Immunol*., 39(14): 839-46, 2003).

Los desencadenantes ambientales del asma pueden activarse por la vía alternativa. Por ejemplo, la exposición in vitro de suero humano a humo de cigarrillo o partículas de escape de diesel resultó en la activación del complemento y el efecto no se vio afectado por la presencia de EDTA, lo que sugiere que la activación fue a través de la vía alternativa en lugar de la clásica (Robbins, RA et al*, Am J. Physiol*. 260: L254-L259, 1991; Kanemitsu, H., et al., *Biol. Pharm. Bull*. 21: 129-132, 1998). La función de las vías del complemento en la inflamación de las vías respiratorias alérgicas se evaluó en un modelo de ratón con sensibilización y desafío con ovoalbúmina. Los ratones de tipo salvaje desarrollaron AHR y la inflamación de las vías respiratorias en respuesta al desafío aeroalérgico. Una proteína de fusión Crry-Ig que inhibe todas las vías de activación del complemento, fue eficaz en la prevención de la AHR y la inflamación pulmonar cuando se administró por vía sistémica o local por inhalación de ovoalbúmina en el modelo de ratón con inflamación alérgica pulmonar (Taube et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 168(11):1333-41, 2003).

En comparación con los ratones de tipo salvaje, los ratones con deficiencia de factor B demostraron menos AHR y la inflamación de las vías respiratorias, mientras que los ratones con deficiencia de C4 tuvieron efectos similares a los ratones de tipo salvaje (Taube, C, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 103:8084-8089, 2006). Estos resultados apoyan un papel para la ruta alternativa y no la participación de la ruta clásica en el modelo de desafío de aeroalergenos murinos. Se proporcionó evidencia adicional de la importancia de la ruta alternativa en un estudio del factor H (FH) utilizando el mismo modelo de ratón (Takeda, K., et al., *J. Immunol*. 188: 661-667, 2012). El FH es un regulador negativo de la vía alternativa y actúa para prevenir las lesiones autólogas de los tejidos propios. Se encontró que el FH endógeno estaba presente en las vías respiratorias durante la exposición al alérgeno y la inhibición del FH con un antagonista competitivo recombinante aumentó la extensión de la AHR y la inflamación de las vías respiratorias (Takeda et al., 2012, *supra*). La administración terapéutica de CR2-fH, una proteína quimérica que une la región de unión iC3b/C3d de CR2 a la región reguladora del complemento del FH que dirige la actividad reguladora del complemento de fH a los sitios de activación del complemento existente, protegió el desarrollo de AHR e infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias después del desafío con alérgenos (Takeda et al., 2012, *supra*). El efecto protector se demostró con la ovoalbúmina y el alérgeno de la ambrosía, que es un alérgeno relevante en los seres humanos.

La función de la activación del complemento dependiente de la lectina en el asma se evaluó en un modelo de ratón con asma fúngica (Hogaboam et al., J. *Leukocyte Biol*. 75:805 814, 2004). Estos estudios utilizaron ratones genéticamente deficientes en lectina de unión a la manosa A (MBL-A), una proteína de unión a carbohidratos que funciona como el componente de reconocimiento para la activación de las vías del complemento de lectina. Los ratones sensibilizados con *Aspergillus fumigatus* de MBL-A (+/+) y MBL-A (-/-) se examinaron los días 4 y 28 después de un i.t. desafío con *A. fumigatus conidia*. La AHR en ratones sensibilizados con MBL-A (-/-) se atenuó significativamente en ambos momentos después de la provocación de los conidios en comparación con el grupo sensibilizado con MBL-A (+/+). Los niveles de citoquinas TH2 en el pulmón (IL-4, IL-5 e IL-13) fueron significativamente más bajos en ratones sensibilizados con *A. fumigatus* de MBL-A (-/-) en comparación con el grupo de tipo salvaje en el día 4 después de los conidios. Estos resultados indican que MBL-A y la vía de la lectina desempeñan una función importante en el desarrollo y mantenimiento de la AHR durante el asma crónica por hongos.

Los hallazgos detallados anteriormente sugieren la participación de la activación del complemento dependiente de lectina en la patogénesis del asma. Los datos experimentales sugieren que la activación del factor B desempeña una función fundamental. En vista de la función fundamental de la LEA-1 en la activación del factor B dependiente de la lectina y la activación posterior de la vía alternativa, se espera que los agentes bloqueadores de la LEA-1 sean beneficiosos para el tratamiento de ciertas formas de asma mediadas por Vía alternativa. Por lo tanto, un tratamiento de este tipo puede ser particularmente útil en el asma inducida por ácaros del polvo doméstico o en el asma causada por factores ambientales como el humo del cigarrillo o el escape de diésel. Por otra parte, las respuestas asmáticas provocadas por el polen de gramíneas probablemente invocan la activación del complemento dependiente de LEA-2. Por lo tanto, se espera que los agentes bloqueadores de LEA-2 sean particularmente útiles en el tratamiento de las condiciones asmáticas en este subconjunto de pacientes.

En vista de los datos detallados anteriormente, los inventores creen que LEA-1 y LEA-2 median la activación del complemento patológico en el asma. Dependiendo del agente alérgico incitante, LEA-1 o LEA-2 pueden estar preferentemente implicados. Por lo tanto, un agente bloqueador de LEA-1 combinado con un agente bloqueador de LEA-2 puede tener utilidad en el tratamiento de múltiples formas de asma, independientemente de la etiología subyacente. Los agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 pueden tener efectos complementarios, aditivos o sinérgicos para prevenir, tratar o revertir la inflamación pulmonar y los síntomas del asma.

La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una sola entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad del asma, que comprende administrar una composición que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que incluye un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar asma. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En una realización, el método de acuerdo con este aspecto de la invención comprende además inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad del asma, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 para un sujeto que sufre o tiene riesgo de desarrollar asma. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad del asma en comparación con la inhibición de solo la LEA-1. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce

específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intra-arterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP-2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y MASP-3, o biespecíficos o agentes inhibidores duales, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de un asma en un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar asma. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como el asma.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar asma, que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une al MASP-3 humano e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar asma, como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84 , (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275

y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

H. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA ENFERMEDAD DE DEPÓSITOS DENSOS Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES MASP-2

La glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) es un trastorno renal que se caracteriza morfológicamente por la proliferación de células mesangiales y el engrosamiento de la pared capilar glomerular debido a la extensión subendotelial del mesangio. La MPGN se clasifica como primaria (también denominada idiopática) o secundaria, con enfermedades subyacentes como enfermedades infecciosas, enfermedades sistémicas del complejo inmunitario, neoplasias, enfermedades crónicas del hígado y otras. La MPGN idiopática incluye tres tipos morfológicos. El tipo I, o MPGN clásico, se caracteriza por depósitos subendoteliales de complejos inmunes y la activación de la vía del complemento clásico. El tipo II, o enfermedad de depósitos densos (DDD), se caracteriza por depósitos densos intra-membranosos adicionales. El tipo III se caracteriza por depósitos subepiteliales adicionales. La MPGN idiopática es rara y representa aproximadamente del 4 al 7 % de las causas renales primarias del síndrome nefrótico (Alchi, B. y Jayne, D. *Pediatr. Nephrol.* 25: 1409-1418, 2010). La MPGN afecta principalmente a niños y adultos jóvenes, y puede presentarse como síndrome nefrótico, síndrome nefrítico agudo, proteinuria asintomática y hematuria, o hematuria macroscópica recurrente. La disfunción renal ocurre en la mayoría de los pacientes y la enfermedad tiene un curso lentamente progresivo, con aproximadamente el 40 % de los pacientes que desarrollan una enfermedad renal en etapa terminal dentro de los 10 años posteriores al diagnóstico (Alchi y Jayne, 2010, *supra*). Las opciones de tratamiento actuales incluyen corticosteroides, inmunosupresores, regímenes antiplaquetarios e intercambio de plasma.

La DDD se diagnostica por la ausencia de inmunoglobulina y la presencia de C3 por la tinción de inmunofluorescencia de las biopsias renales, y la microscopía electrónica muestra depósitos densos osmiofílicos característicos a lo largo de las membranas basales glomerulares. La DDD es causada por la desregulación de la vía alternativa del complemento (Sethi et al., *Clin J Am Soc Nephrol.* 6 (5): 1009-17, 2011), que puede surgir de varios mecanismos diferentes. La anomalía más común del sistema del complemento en la DDD es la presencia de factores nefríticos C3 que

son autoanticuerpos contra la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) que aumenta su vida media y, por lo tanto, la activación de la vía (Smith, RJH et al., *Mol. Immunol* 48: 1604-1610, 2011). Otras anomalías de las vías alternativas incluyen el autoanticuerpo del factor H que bloquea la función del factor H, las mutaciones de ganancia de función C3 y la deficiencia genética del factor H (Smith et al., 2011, *supra*). Los informes de casos recientes muestran que el tratamiento con eclizumab (anticuerpo monoclonal anti-C5) se asoció con mejoras en la función renal en dos pacientes con DDD (Daina, E. et al., *New Engl. J. Med.* 366: 1161-1163, 2012; Vivarelli, M. y otros, *New Engl. J. Med*. 366: 1163-1165, 2012), lo que sugiere una función causal para la activación del complemento en los resultados renales.

Dados los datos clínicos genéticos, funcionales e inmunohistoquímicos y anecdóticos anteriores, la función central del complemento en la patogénesis de la DDD está bien establecida. Por lo tanto, se espera que las intervenciones que bloquean los mecanismos de activación del complemento, o los productos de activación del complemento posterior, sean terapéuticamente útiles para tratar esta afección.

Si bien los datos genéticos humanos sugieren que el control inapropiado o la activación excesiva del bucle de amplificación de las vías alternativas desempeñan una función clave, no se han identificado eventos que inicien el complemento. Los estudios inmunohistoquímicos en biopsias renales muestran evidencia de depósito de MBL en tejido enfermo, lo que sugiere la participación de las vías de lectina en el inicio de la activación del complemento patológico en DDD (Lhotta et al, *Nephrol Dial Transplant.,* 14 (4): 881-6, 1999). La importancia de la vía alternativa se ha corroborado aún más en los modelos experimentales. Los ratones deficientes en factor H desarrollan proteinuria progresiva y las lesiones patológicas renales características de la condición humana (Pickering et al., *Nat Genet.,* 31 (4): 424, 2002). Pickering et al. Además, demostraron que la ablación del factor B, que produce la activación de la vía alternativa dependiente de LEA-1, protege completamente a los ratones deficientes en factor H de la DDD (Pickering et al., *Nat Genet.,* 31 (4): 424, 2002).

Por lo tanto, se espera que los agentes que bloquean LEA-1 bloquearán de manera efectiva la activación dependiente de la lectina de la vía alternativa y, por lo tanto, brinden un tratamiento efectivo para la DDD. Dado que el bucle de amplificación de la vía alternativa está desregulado en pacientes con DDD, también se puede esperar que los agentes que bloquean el bucle de amplificación sean efectivos. Dado que los agentes dirigidos a LEA-1 que bloquean MASP-1 o MASP-1 y MASP-3 inhiben la maduración del factor D, se predice que tales agentes bloquearán efectivamente el bucle de amplificación de la vía alternativa.

Como se detalló anteriormente, se ha encontrado una deposición pronunciada de MBL en muestras renales enfermas, destacando la probable participación de eventos de activación conducidos por lectina en la patogénesis de la DDD. Una vez que se establece una lesión tisular inicial en los capilares glomerulares, es probable que se produzca una unión de MBL adicional al endotelio glomerular lesionado y a las estructuras mesangiales subyacentes. Se sabe que tales lesiones tisulares conducen a la activación de LEA-2, lo que puede causar una activación adicional del complemento. Por lo tanto, también se espera que los agentes bloqueadores de LEA-2 tengan utilidad en la prevención de la activación adicional del complemento en las estructuras glomerulares lesionadas y, por lo tanto, eviten una mayor progresión de la enfermedad hacia la insuficiencia renal terminal.

Los datos detallados anteriormente sugieren que LEA-1 y LEA-2 promueven procesos separados de activación del complemento patológico en la DDD. Por lo tanto, se espera que un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2, ya sea solos o en combinación, sean útiles para tratar la DDD.

Cuando se usan en combinación, se espera que los agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 sean más eficaces que cualquiera de los agentes solos, o que sean útiles para tratar diferentes etapas de la enfermedad. Los agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 pueden tener efectos complementarios, aditivos o sinérgicos para prevenir, tratar o revertir la disfunción renal asociada a la DDD.

La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA2. De manera óptima, los agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 con función inhibidora pueden incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o una doble especificidad Anticuerpo donde cada sitio de unión puede unirse a y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad por depósito denso, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una agente inhibidor LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que sufre o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad por depósito denso. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes

no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad de depósito denso, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar enfermedad por depósito denso. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad de depósito denso, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 para un sujeto que sufre o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad por depósito denso.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de la enfermedad por depósito denso en comparación con la inhibición de la LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

Los agentes inhibidores de LEA-1 y/o LEA-2 pueden administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa,

intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y/o MASP-3), o agentes inhibidores biespecíficos o duales, o coadministración de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad por depósito denso en un sujeto que lo necesite. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la enfermedad de depósito denso.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad por depósito denso que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a la MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad de depósito denso, tal como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID Nº: 161.

I. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA GLOMERULONEFRITIS CRESCÉNTICA NECROTIZANTE PAUCI-INMUNE, Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES DE MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON Y AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2.

La glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune (NCGN) es una forma de glomerulonefritis rápidamente progresiva en la que las paredes capilares

glomerulares muestran signos de inflamación, pero tienen una escasez de inmunocomplejos detectables o anticuerpos contra la membrana basal glomerular. La afección se asocia con una rápida disminución de la función renal. La mayoría de los pacientes con NCGN tienen autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA) y, por lo tanto, pertenecen a un grupo de enfermedades denominadas vasculitis asociada a ANCA. La vasculitis es un trastorno de los vasos sanguíneos que se caracteriza por inflamación y necrosis fibrinoide de la pared vascular. Las vasculitis sistémicas se clasifican según el tamaño del vaso: grande, mediano y pequeño. Varias formas de vasculitis de pequeños vasos se asocian con la presencia de ANCA, a saber, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss y vasculitis limitada renal (NCGN). Además, pueden ser una manifestación de afecciones subyacentes como el lupus eritematoso sistémico. Los antígenos objetivo para ANCA incluyen proteinasa-3 (PR3) y mieloperoxidasa (MPO). La NCGN Pauci-inmune es rara, con una incidencia reportada de aproximadamente 4 por millón en Wessex, Reino Unido (Hedger, N. et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1593-1599, 2000). En la serie Wessex de 128 pacientes con NCGN pauci-inmune, el 73% era ANCA positivo y el 59% de los pacientes requería diálisis inicial y el 36% necesitaba diálisis a largo plazo. Los tratamientos para la NCGN pauci-inmune incluyen corticosteroides y agentes inmunosupresores como ciclofosfamida y azatioprina. Las opciones de tratamiento adicionales para las vasculitis asociadas a ANCA incluyen rituximab e intercambio de plasma (Chen, M. y Kallenberg, C.G.M. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6: 653-664, 2010).

Aunque la NCGN se caracteriza por una escasez de deposición del complemento, la vía alternativa del complemento se ha implicado en su patogénesis. Una evaluación de biopsia renal de 7 pacientes con NCGN pauci-inmune asociada a MPO-ANCA detectó la presencia de complejo de ataque a la membrana, C3d, factor B y factor P (que no se detectaron en biopsias de controles normales o pacientes con enfermedad de cambio mínimo), mientras que C4d y la lectina de unión a manosa no se detectaron, lo que sugiere una activación selectiva de la vía alternativa (Xing, G.Q. et al. *J. Clin. Immunol*. 29: 282-291, 2009). La NCGN experimental se puede inducir mediante la transferencia de IgG anti-MPO a ratones de tipo salvaje o esplenocitos anti-MPO a ratones inmunodeficientes (Xiao, H. et al, *J. Clin. Invest.* 110: 955-963, 2002). En este modelo de ratón de NCGN, se investigó la función de las vías específicas de activación del complemento utilizando ratones knockout. Después de la inyección de anti-MPO IgG, los ratones C4 -/- desarrollaron una enfermedad renal comparable a la de los ratones de tipo salvaje, mientras que los ratones C5 -/- y factor B -/- no desarrollaron una enfermedad renal, lo que indica que la vía alternativa estaba involucrada en este modelo y las vías clásicas y de lectina no (Xiao, H. et al.

Am. J. Pathol. 170: 52-64, 2007). Además, la incubación de MPO-ANCA o PR3-ANCA IgG de pacientes con neutrófilos humanos cebados con TNF causó la liberación de factores que dieron como resultado la activación del complemento en suero humano normal, según lo detectado por la generación de C3a; este efecto no se observó con la IgG en sujetos sanos, lo que sugiere el posible papel patógeno de ANCA en la activación del complemento y los neutrófilos (Xiao et al., 2007, *supra*).

Con base en la función descrita anteriormente para la vía alternativa en esta afección, se espera que el bloqueo de la activación de la vía alternativa tenga utilidad en el tratamiento de NCGN ANCA positiva. Dado el requisito de la activación de fB para la patogenia, se espera que los inhibidores de la LEA-1 sean particularmente útiles para tratar esta afección y para prevenir una mayor disminución de la función renal en estos pacientes.

Otro subgrupo de pacientes desarrolla vasulitis renal progresiva con formación de media luna acompañada de una rápida disminución de la función renal en ausencia de ANCA. Esta forma de la afección se denomina NCGN de ANCA negativo y constituye aproximadamente un tercio de todos los pacientes con NCGN pauci inmune (Chen et al, *JASN* 18 (2): 599-605, 2007). Estos pacientes tienden a ser más jóvenes y los resultados renales tienden a ser particularmente graves. (Chen et al, *Nat Rev Nephrol*., 5 (6): 313-8, 2009). Una característica patológica discriminante de estos pacientes es la deposición de MBL y C4d en lesiones renales (Xing et al., *J Clin Immunol.* 30 (1): 144-56, 2010). La intensidad de la tinción de MBL y C4d en las biopsias renales se correlacionó negativamente con la función renal (Xing et al., 2010, *supra*). Estos hallazgos sugieren una función importante para la activación del complemento dependiente de lectina en la patogénesis. El hecho de que C4d, pero no el factor B, se encuentre comúnmente en muestras de tejidos enfermos indica la participación de LEA-2.

Con base en la función de la activación del complemento dependiente de lectina en la NCGN de ANCA negativo descrita anteriormente, se espera que el bloqueo de la activación de la vía LEA-2 tenga utilidad en el tratamiento de la NCGN de ANCA negativo.

Los datos detallados anteriormente sugieren que LEA-1 y LEA-2 mediado la activación del complemento patológico en NCGN de ANCA positivo y ANCA negativo, respectivamente. Por lo tanto, se espera que un agente bloqueador de LEA-1 combinado con un agente bloqueador de LEA-2 tenga utilidad en el tratamiento de todas las formas de NCGN pauci-inmune, independientemente de la etiología subyacente. Los agentes bloqueadores de LEA-1 y LEA-2 pueden tener efectos complementarios, aditivos o sinérgicos para prevenir, tratar o revertir la disfunción renal asociada a NCGN.

Los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada uno el sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauciinmune, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que sufre o tiene riesgo de desarrollar glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la afección se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauciinmune, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que sufre o corre el riesgo de desarrollar una glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende la inhibición de la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una MASP-2 agente inhibidor y un agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 para un sujeto que lo necesite.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una

combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y la LEA-2 proporcionen un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune en comparación con inhibición de LEA-1 solo. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y / o MASP-3), o agentes inhibidores biespecíficos o duales, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas

con AP, tales como la glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune. (NCGN).

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune (NCGN) que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a la MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar una glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune (NCGN), tal como, por ejemplo, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID Nº: 161.

J. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN LOS ANTICUERPOS INHIBIDORES DE MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

La lesión cerebral traumática (TBI, por sus siglas en inglés) es un importante problema de salud mundial que causa al menos 10 millones de muertes u hospitalizaciones al año (Langlois, J.A. et al., J. *Head Trauma Rehabil*. 21: 375-378, 2006). En el 2003, se estimaron 1.6 millones de TBI en los Estados Unidos, incluyendo 1.2 millones de visitas al departamento de emergencias, 290,000 hospitalizaciones y 51,000 muertes (Rutland-Brown, W. et al, J. *Head Trauma Rehabil*. 21: 544-548, 2006). La mayoría de las TBI en los Estados Unidos son causadas por caídas y tráfico vehicular. La TBI puede resultar en consecuencias físicas, cognitivas, de comportamiento y emocionales a largo plazo o de por vida. Más de 5 millones de estadounidenses viven con una discapacidad a largo plazo o de por vida asociada con una TBI (Langlois et al., 2006, *supra*).

La TBI puede implicar la penetración de la sustancia cerebral (lesiones "penetrantes") o lesiones que no penetran en el cerebro (lesiones "cerradas"). Los perfiles de lesión y las secuelas neuroconductuales asociadas pueden ser bastante diferentes entre la TBI penetrante y cerrada. Aunque cada lesión es única, ciertas regiones del cerebro son particularmente vulnerables al daño provocado por un

traumatismo, que incluye la corteza frontal y la sustancia blanca subfrontal, los ganglios basales y el diencéfalo, el tallo cerebral rostral y los lóbulos temporales que incluyen el hipocampo (McAllister, TW *Dialogues Clin. Neurosci.* 13: 287-300, 2011). La TBI puede provocar cambios en varios sistemas de neurotransmisores, incluida la liberación de glutamato y otros aminoácidos excitadores durante la fase aguda y alteraciones crónicas en los sistemas catecolaminérgico y colinérgico, que pueden estar asociados con la discapacidad neuroconductual (McAllister, 2011, *supra*). Los sobrevivientes de una TBI significativa a menudo sufren de defectos cognitivos, cambios de personalidad y trastornos psiquiátricos aumentados, especialmente depresión, ansiedad y trastorno de estrés postraumático. A pesar de la intensa investigación, aún no se ha encontrado un tratamiento clínicamente eficaz para la TBI que pueda reducir la mortalidad y morbilidad, y mejorar el resultado funcional.

Factores complementarios y TBI

Numerosos estudios han identificado una relación de proteínas del complemento y trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, el síndrome de Guillain-Barré, el lupus cerebral y el accidente cerebrovascular (revisado en Wagner, E., et al., *Nature Rev Drug Disc.* 9: 43-56, 2010). Recientemente se ha demostrado una función para C1q y C3 en la eliminación de sinapsis, por lo que es probable que los factores del complemento estén involucrados tanto en la función normal del CNS como en la enfermedad neurodegenerativa (Stevens, B. et al., *Cell* 131: 1164–1178, 2007). El gen para MASP-1 y MASP-3 se expresa ampliamente en el cerebro y también en una línea celular de glioma, T98G (Kuraya, M. et al., *Int Immunol*., 15: 109-17, 2003), consistente con una función de la vía de la lectina en el CNS.

MASP-1 y MASP-3 son claves para la defensa inmediata contra los patógenos y las auto-células alteradas, pero la vía de la lectina también es responsable del daño tisular grave después del accidente cerebrovascular, el ataque cardíaco y otras lesiones por isquemia- reperfusión. De manera similar, MASP-1 y MASP-3 son probablemente mediadores en el daño tisular causado por la TBI. Se ha demostrado que la inhibición del factor B en la vía alternativa atenúa la TBI en dos modelos de ratón. Los ratones knockout del factor B están protegidos de la neuroinflamación mediada por el complemento y la neuropatología después de una TBI (Leinhase I, et al., *BMC Neurosci.* 7:55, 2006). Además, el anticuerpo anti-factor B atenuó el daño al tejido cerebral y la muerte de las células neuronales en ratones inducidos por TBI (Leinhase I, et al*., J Neuroinflammation* 4:13, 2007). MASP-3 activa directamente el Factor B (Iwaki, D. et al., *J Immunol.* 187: 3751-8, 2011) y, por lo tanto, también es un mediador probable en la TBI. Similar a la inhibición del factor B, se espera que los inhibidores de la LEA-1, como los anticuerpos contra MASP-3, proporcionen una

estrategia prometedora para tratar el daño tisular y las secuelas subsiguientes en la TBI.

Por lo tanto, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 pueden tener un beneficio terapéutico independiente en la TBI. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada uno el sitio de unión puede unirse y bloquear MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, o reducir la gravedad de la lesión cerebral traumática, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que sufre una lesión cerebral traumática. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, como la administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, intracraneal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por Administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de la lesión cerebral traumática, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece una lesión cerebral traumática. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de la lesión cerebral traumática, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP -1, MASP-3 o agente inhibidor de MASP-1/3 para un sujeto que sufre una lesión cerebral traumática.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento

dependiente de LEA-2. Como se explicó anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento o la reducción de la gravedad de la lesión cerebral traumática en comparación con la inhibición de LEA-1 sola. . Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea, intracraneal u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y/o MASP-3), o agentes inhibidores biespecíficos o dobles, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar o reducir la gravedad de la lesión cerebral traumática. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la lesión cerebral traumática.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar una lesión cerebral traumática que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a la MASP-3 humana. e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar lesión cerebral traumática, como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ. ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

K. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA NEUMONÍA DE ASPIRACIÓN Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN ANTICUERPOS INHIBIDORES DE MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES DE LA MASP-2

La aspiración se define como la inhalación de contenido orofaríngeo o gástrico en las vías respiratorias inferiores. La aspiración puede resultar en complicaciones de neumonitis por aspiración (química), neumonía por aspiración bacteriana primaria o infección bacteriana secundaria de neumonitis química. Los factores de riesgo para la aspiración incluyen disminución de los niveles de conciencia (por ejemplo, traumatismo craneal, alteraciones inducidas por el alcohol o las drogas en el sensorio, accidente cerebrovascular), diversas anomalías gastrointestinales y esofágicas y enfermedades neuromusculares. Se estima que 5-15 % de los 4.5 millones de casos de neumonía adquirida en la comunidad se deben a neumonía por aspiración (Marik, P.E. *New Engl. J.* Med. 344: 665-671, 2001). El tratamiento de la neumonitis química es principalmente de apoyo, y el uso de antibióticos empíricos es controvertido. El tratamiento de la neumonía por aspiración bacteriana se realiza con los antibióticos apropiados, que se basan en si la aspiración se produjo en la comunidad o en el hospital, ya que los organismos causales probables difieren entre estos entornos. Se deben tomar medidas para prevenir la aspiración en pacientes de alto riesgo, por

ejemplo, pacientes ancianos en hogares de ancianos que tienen reflejos nauseosos deficientes. Las medidas que han demostrado ser una profilaxis eficaz incluyen la elevación de la cabecera de la cama durante la alimentación, la profilaxis dental y una buena higiene bucal. Los antibióticos profilácticos no han demostrado ser efectivos y están desaconsejados, ya que pueden conducir a la aparición de organismos resistentes.

Se ha propuesto la modulación de los componentes del complemento para numerosas indicaciones clínicas, incluidas las enfermedades infecciosas (sepsis, infecciones virales, bacterianas y micóticas) y afecciones pulmonares: síndrome de dificultad respiratoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis quística (revisado en Wagner, E., et al., *Nature Rev Drug Disc.* 9: 43-56, 2010). El apoyo a esta propuesta es proporcionado por numerosos estudios clínicos y genéticos. Por ejemplo, hay una frecuencia significativamente menor de pacientes con niveles bajos de MBL con tuberculosis clínica (Soborg et al., *Journal of Infectious Diseases* 188: 777–82, 2003), lo que sugiere que los niveles bajos de MBL se asocian con la protección contra la enfermedad.

En un modelo murino de lesión por aspiración de ácido, Weiser MR et al., *J. Appl. Physiol.* 83 (4): 1090-1095, 1997, demostraron que los ratones knockout para C3 estaban protegidos de lesiones graves; mientras que los ratones knockout para C4 no estaban protegidos, lo que indica que la activación del complemento está mediada por la vía alternativa. En consecuencia, se espera que el bloqueo de la vía alternativa con los inhibidores de LEA-1 proporcione un beneficio terapéutico en la neumonía por aspiración.

Por lo tanto, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 pueden tener un beneficio terapéutico independiente en la neumonía por aspiración. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de enlace se une y bloquea MASP-1/3 o MASP-2.

Un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar la neumonía por aspiración administrando una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de

MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que padece tal afección u otra neumonía mediada por el complemento. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse localmente al pulmón, como por un inhalador. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administracion oral. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la neumonía por aspiración, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que sufre o tiene riesgo de desarrollar neumonía por aspiración. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la neumonía por aspiración, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar neumonía por aspiración. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de la neumonía por aspiración, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP 1, MASP-3, o agente inhibidor de MASP-1/3 para un sujeto que padece neumonía por aspiración. En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento o la reducción de la gravedad de la neumonía por aspiración en comparación con la inhibición de la LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la

administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor del MASP-2 se puede administrar al sujeto sistémicamente, como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalación, nasal, subcutánea u otra administración parenteral, o potencialmente por la administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración se puede repetir según lo determinado por un médico hasta que la condición ha sido resuelta o controlada.

Aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención puede llevarse a cabo por una administración única de la composición (por ejemplo, una sola composición que comprende a agentes inhibidores MASP-2 o MASP-3, o tienen o agentes doble inhibidor o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de las administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la neumonía por aspiración en un sujeto que la necesite. Alternativamente, la composición se puede administrar a intervalos periódicos como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que la necesite.

Como se describe en los ejemplos 11-21, se han generado anticuerpos inhibidores del MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades relacionadas con el AP o afecciones, tales como neumonía por aspiración.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar neumonía por aspiración que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de

alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar neumonía por aspiración, como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO : 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

L. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA ENDOFTALMITIS Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN LOS ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

La endoftalmitis es una afección inflamatoria de las cavidades intraoculares y generalmente es causada por una infección. La endoftalmitis puede ser endógena, como resultado de la propagación hematógena de organismos de una fuente de infección distante (p. Ej., endocarditis), o exógena, de la inoculación directa de un organismo desde el exterior como una complicación de la cirugía ocular, cuerpos extraños y/o contundentes. Traumatismo ocular penetrante. La endoftalmitis exógena es mucho más común que la endógena y la mayoría de los casos de endoftalmitis exógena se producen después de la cirugía ocular. En los Estados Unidos, la cirugía de cataratas es la principal causa de endoftalmitis y ocurre en 0.1-0.3 % de este procedimiento, con un aumento aparente en la incidencia durante la última década (Taban, M. et al., *Arch. Ophthalmol.* 123: 613-620, 2005). La endoftalmitis posquirúrgica puede presentarse de forma aguda, dentro de las 2 semanas de la cirugía, o retrasada, meses después de la cirugía. La endoftalmitis aguda generalmente se presenta con dolor, enrojecimiento, hinchazón de los párpados y disminución de la agudeza visual. La endoftalmitis de inicio tardío es menos común que la forma aguda y los pacientes pueden reportar solo dolor leve y fotosensibilidad. El tratamiento de la endoftalmitis depende de la causa subyacente y puede incluir antibióticos sistémicos y/o intravítreos. La endoftalmitis puede causar disminución o pérdida de la visión.

Como se describió anteriormente para la AMD, los genes de la vía del complemento múltiple se han asociado con trastornos oftalmológicos, y estos incluyen específicamente los genes de la vía de la lectina. Por ejemplo, MBL2 se ha identificado con subtipos de AMD (Dinu V, et al., *Genet Epidemiol* 31: 224-37, 2007). Es probable que las vías LEA-1 y LEA-2 estén involucradas en afecciones inflamatorias

oculares como la endoftalmitis (Chow SP et al., *Clin Experiment Ophthalmol,* 39: 871-7, 2011). Chow et al., examinó los niveles de MBL de los pacientes con endoftalmitis y demostró que tanto los niveles de MBL como la actividad de la vía de lectina funcional están significativamente elevadas en los ojos humanos inflamados pero no detectables en los ojos de control no inflamados. Esto sugiere una función para la MBL y la vía de la lectina en afecciones inflamatorias oculares que amenazan la vista, en particular la endoftalmitis. Además, en un modelo murino de queratitis fúngica corneal, el gen MBL-A fue uno de los cinco genes de la vía inflamatoria regulados al alza (Wang Y., et al., *Mol Vis* 13: 1226-33, 2007).

Por lo tanto, se espera que los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 tengan beneficios terapéuticos independientes en el tratamiento de la endoftalmitis. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr beneficios de tratamiento adicionales en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de enlace se une y bloquea MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la endoftalmitis, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar endoftalmitis. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse localmente en el ojo, por ejemplo mediante irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel, ungüento o gotas tópicas, o por administración intravítrea. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la

endoftalmitis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece o en riesgo de desarrollar endoftalmitis. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de la endoftalmitis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP-1, MASP-3 o agente inhibidor de MASP-1/3 para un sujeto que padece endoftalmitis.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de la endoftalmitis, en comparación con la inhibición de LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse localmente en el ojo, tal como por irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel tópico, ungüento o gotas, o por inyección intravítrea. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y/o MASP-3, o agentes inhibidores biespecíficos o duales, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la endoftalmitis en un sujeto que la necesite. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la endoftalmitis.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar endoftalmitis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une a MASP-3 humana. e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar endoftalmitis, como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84 , (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

M. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA NEUROMIELITIS OPTICA, Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN LOS ANTICUERPOS INHIBIDORES DE MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

La neuromielitis óptica (NMO) es una enfermedad autoinmune que ataca los nervios ópticos y la médula espinal. Esto provoca la inflamación del nervio óptico, conocida como neuritis óptica, y la médula espinal, conocida como mielitis. Las lesiones de la médula espinal en NMO pueden provocar debilidad o parálisis en las piernas o los brazos, ceguera, disfunción de la vejiga y el intestino y disfunción sensorial.

La NMO comparte varias similitudes con la esclerosis múltiple (MS), ya que ambas se deben al ataque inmunitario de los objetivos del CNS y dan como resultado desmielinización (Papadopoulos y Verkman*, Lancet Neurol*., 11 (6): 535-44, 2013). Sin embargo, las objetivos moleculares, los tratamientos y las lesiones para la NMO son distintas de las de la MS. Si bien la MS está mediada en gran medida por las células T, los pacientes con NMO suelen tener anticuerpos dirigidos a la proteína del canal de agua, la acuaporina 4 (AQP4), una proteína que se encuentra en los astrocitos que rodean la barrera hematoencefálica. El interferón beta es la terapia más comúnmente utilizada para la MS, pero en general se reconoce que es dañina en la NMO. Las lesiones inflamatorias de la NMO se encuentran en la médula espinal y el nervio óptico, y pueden progresar hacia el cerebro, incluida la materia blanca y gris. La desmielinización que se produce en las lesiones de NMO está mediada por el complemento (Papadopoulos y Verkman, *Lancet Neurol*., 11 (6): 535-44, 2013).

La citotoxicidad dependiente del complemento parece ser el principal mecanismo que causa el desarrollo de NMO. Más del 90 % de los pacientes con NMO tienen anticuerpos IgG contra AQP4 (Jarius y Wildemann, Jarius S, Wildemann B., *Nat Rev Neurol*. 2010 Jul; 6 (7): 383-92). Estos anticuerpos inician la formación de una lesión en la barrera hematoencefálica. El complejo inicial antígeno-anticuerpo (AQP4/AQP4-IgG) en la superficie de los astrocitos activa la vía clásica del complemento. Esto da como resultado la formación del complejo de ataque a la membrana en la superficie de los astrocitos, lo que lleva a la infiltración de granulocitos, la desmielinización y, finalmente, la necrosis de los astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Misu et al., *Acta Neuropathol* 125 (6): 815-27, 2013). Estos eventos celulares se reflejan en la destrucción de tejidos y la formación de lesiones quísticas y necróticas.

La vía clásica del complemento claramente es crítica para la patogénesis de la NMO. Las lesiones de NMO muestran una deposición vasculocéntrica de inmunoglobulina y componentes del complemento activados (Jarius et al., *Nat Clin Pract Neurol.* 4 (4): 202-14, 2008). Además, las proteínas del complemento como C5a se han aislado del líquido cefalorraquídeo de pacientes con NMO (Kuroda et al., *J Neuroimmunol*., 254 (1-2): 178-82, 2013). Además, la IgG sérica obtenida de pacientes con NMO puede causar citotoxicidad dependiente del complemento en un modelo de NMO de ratón (Saadoun et al., *Brain*, 133 (Pt 2): 349-61, 2010). Un anticuerpo monoclonal contra C1q previene la destrucción mediada por el complemento de los astrocitos y las lesiones en un modelo de ratón de NMO (Phuan et al., *Acta Neuropathol*, 125 (6): 829-40, 2013).

La vía alternativa del complemento sirve para amplificar la actividad general del complemento. Harboe y colegas (2004) demostraron que el bloqueo selectivo de

la vía alternativa inhibió más del 80 % de la formación del complejo de ataque a la membrana inducida por la vía clásica (Harboe et al., *Clin Exp Immunol* 138 (3): 439-46, 2004). Tüzün y colegas (2013) examinaron los productos de vía clásica y alternativa en pacientes con NMO (Tüzün E, et al., *J Neuroimmunol.* 233 (1-2): 211-5, 2011). C4d, el producto de degradación de C4, se midió para evaluar la actividad de la vía clásica y se incrementó en los sueros de pacientes con NMO en comparación con los controles (una elevación de 2.14 veces). Además, se observó un aumento del Factor Bb, el producto de descomposición de la vía alternativa Factor B, en pacientes con NMO en comparación con pacientes con MS o individuos con control normal (una elevación de 1.33 veces). Esto sugiere que la función de la vía alternativa también se incrementa en NMO. Se esperaría que esta activación aumentara la activación general del complemento, y de hecho sC5b-9, el producto final de la cascada del complemento, se incrementó significativamente (una elevación de 4.14 veces).

Se espera que los inhibidores específicos de MASP-3 proporcionen beneficios en el tratamiento de pacientes que sufren de NMO. Como se demuestra aquí, el suero que carece de MASP-3 no puede activar el Factor B, un componente esencial de la C5 convertasa, o Factor D, el activador central de la vía alternativa. Por lo tanto, también se esperaría que el bloqueo de la actividad de MASP-3 con un agente inhibidor, como un anticuerpo o una molécula pequeña, inhiba la activación del Factor B y Factor D. La inhibición de estos dos factores detendrá la amplificación de la vía alternativa, lo que resultará en una disminución general complemento de la actividad. La inhibición de MASP-3 debería mejorar significativamente los resultados terapéuticos en NMO.

Por lo tanto, se espera que los inhibidores de LEA-1 y/o LEA-2 tengan un beneficio terapéutico independiente en el tratamiento de NMO. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión se une y bloquea MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la NMO, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente

inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar NMO. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse localmente en el ojo, por ejemplo mediante irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel, ungüento o gotas tópicas, o por administración intravítrea. . Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por Administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la NMO, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece o se encuentra en riesgo de desarrollar NMO. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de NMO, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP-1, MASP-3, o agente inhibidor de MASP-1/3 para un sujeto que padece NMO.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente la LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de la NMO, en comparación con la inhibición de la LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio

de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse localmente en el ojo, tal como por irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel tópico, ungüento o gotas, o por inyección intravítrea. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP 2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y/o MASP-3, o agentes inhibidores biespecíficos o dobles, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la NMO en un sujeto que la necesite. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que la necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la neuromielitis óptica (NMO).

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar neuromielitis optica (NMO). que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento que se une al MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar neuromielitis óptica (NMO), como por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que

comprende la SEQ ID Nº: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

N. LA FUNCIÓN DE MASP-3 EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET Y LOS MÉTODOS TERAPÉUTICOS QUE UTILIZAN LOS ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA MASP-3, OPCIONALMENTE EN COMBINACIÓN CON LOS AGENTES INHIBIDORES DE MASP-2

La enfermedad de Behçet, o el síndrome de Behçet, es una vasculitis sistémica de pequeños vasos mediada por el sistema inmunitario que a menudo se presenta con ulceración de la membrana mucosa y problemas oculares. La enfermedad de Behçet (BD) fue nombrada en 1937 por el dermatólogo turco Hulusi Behçet, quien describió por primera vez el complejo de síntomas triples de las úlceras orales recurrentes, las úlceras genitales y la uveítis. La BD es un trastorno inflamatorio sistémico y recurrente de causa desconocida. La perivasculitis inflamatoria de BD puede afectar los sistemas gastrointestinal, pulmonar, musculoesquelético, cardiovascular y neurológico. La BD puede ser fatal debido a la rotura de aneurismas vasculares o complicaciones neurológicas graves. La neuropatía óptica y la atrofia pueden deberse a vasculitis y oclusión de los vasos que suministran al nervio óptico. Ver Al-Araji A, et al., *Lancet Neurol*., 8 (2): 192-204, 2009.

La incidencia más alta de BD se encuentra en las regiones de Oriente Medio y Extremo Oriente, pero es rara en Europa y América del Norte. A menudo, la BD se controla inicialmente con corticosteroides e inmunosupresores, pero muchos casos son refractarios con morbilidad y mortalidad graves. Los agentes biológicos, incluidos el interferón alfa, la IgIV, el anti-TNF, el anti-IL-6 y el anti-CD20, han mostrado beneficios en algunos casos, pero no hay consenso sobre el mejor tratamiento.

Si bien el BD es claramente un trastorno inflamatorio, su patobiología no está clara. Existen asociaciones genéticas con los antígenos HLA y los estudios de asociación amplia del genoma han implicado numerosos genes de citoquinas (Kirino et al., *Nat Genet*, 45 (2): 202-7, 2013). La hiperactividad del sistema inmunitario parece estar regulada por el sistema del complemento. Se han observado mayores niveles de C3 en los sueros de pacientes con BD (Bardak y Aridoğan, *Ocul Immunol Inflamm* 12 (1): 53-8, 2004), y el aumento de C3 y C4 en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona con la enfermedad (Jongen et al., *Arch. Neurol*, 49 (10): 1075-8, 1992).

Tüzün y colegas (2013) examinaron productos de vía clásica y alternativa en sueros de pacientes con BD (Tüzün E, et al., *J Neuroimmunol*, 233 (1-2): 211-5, 2011). 4d, el producto de descomposición de C4, se genera ascendente de la vía alternativa y se midió para evaluar la actividad de la vía clásica inicial. C4d aumentó

en los sueros de pacientes con BD en comparación con los controles (una elevación de 2.18 veces). El factor Bb es el producto de descomposición del factor B y se midió para determinar la actividad de la vía alternativa. Los pacientes con BD tuvieron un aumento del factor Bb en comparación con los individuos normales de control (una elevación de 2.19 veces), lo que concuerda con un aumento en la función de la vía alternativa de BD. Debido a que la vía alternativa del complemento sirve para amplificar la actividad general del complemento, se esperaría que esta activación aumentara la activación general del complemento. Harboe y colegas (2004) demostraron que el bloqueo selectivo de la vía alternativa inhibió más del 80 % de la formación del complejo de ataque a la membrana inducida por la vía clásica (Harboe M, et al., *Clin Exp Immunol*, 138 (3): 439-46, 2004). De hecho, sC5b-9, el producto final de la cascada del complemento, se incrementó significativamente en los pacientes con BD (una elevación de 5.46 veces). Los inhibidores específicos de MASP-3 deberían proporcionar beneficios en BD. El bloqueo de MASP-3 debería inhibir la activación del Factor B y Factor D. Esto detendrá la amplificación de la vía alternativa, lo que resultará en una respuesta disminuida de la actividad general del complemento. La inhibición de MASP-3 debería por lo tanto mejorar significativamente los resultados terapéuticos en BD. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de LEA-1 y / o LEA-2 tengan un beneficio terapéutico independiente en el tratamiento de la BD. Además, los inhibidores de LEA-1 y LEA-2 utilizados juntos pueden lograr un beneficio de tratamiento adicional en comparación con cualquiera de los agentes solos, o pueden proporcionar un tratamiento eficaz para un espectro más amplio de subconjuntos de pacientes. La inhibición combinada de LEA-1 y LEA-2 se puede lograr mediante la administración conjunta de un agente bloqueador de LEA-1 y un agente bloqueador de LEA-2. Óptimamente, la función inhibidora de LEA-1 y LEA-2 puede incluirse en una única entidad molecular, como un anticuerpo biespecífico compuesto de MASP-1/3 y un sitio de unión específico de MASP-2, o un anticuerpo de especificidad dual donde cada sitio de unión se une y bloquea MASP-1/3 o MASP-2.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención proporciona así un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de BD, que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de LEA-1 que comprende un agente inhibidor de MASP-1, un agente inhibidor de MASP-3, o una combinación de un agente inhibidor de MASP-1/3, en un portador farmacéutico para un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar BD. La composición inhibidora de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse localmente en el ojo, por ejemplo mediante irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel,

ungüento o gotas tópicos, o por administración intravítrea. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-1, MASP-3 o MASP-1/3 puede administrarse al sujeto de manera sistémica, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral de agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-2 para tratar, prevenir o reducir la gravedad de BD, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 a un sujeto que padece o está a riesgo de desarrollar BD. En otro aspecto, se proporciona un método que comprende inhibir la activación del complemento dependiente de LEA-1 y LEA-2 para tratar, o reducir la gravedad de BD, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de MASP-2 y una MASP-1, MASP-3, o agente inhibidor de MASP-1/3 para un sujeto que padece BD.

En algunas realizaciones, el método comprende inhibir tanto la activación del complemento dependiente de LEA-1 como la activación del complemento dependiente de LEA-2. Como se detalló anteriormente, se espera que el uso de una combinación de agentes farmacológicos que bloquean individualmente LEA-1 y LEA-2 proporcione un mejor resultado terapéutico en el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de BD, en comparación con la inhibición de LEA-1 sola. Este resultado se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración conjunta de un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-1 junto con un anticuerpo que tenga actividad bloqueadora de LEA-2. En algunas realizaciones, las actividades de bloqueo de LEA-1- y LEA-2 se combinan en una única entidad molecular, y esa entidad con la actividad de bloqueo combinada de LEA-1- y LEA-2. Dicha entidad puede comprender o consistir en un anticuerpo biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-1 y bloquee LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconozca específicamente MASP-2 y bloquee LEA-2. Alternativamente, dicha entidad puede consistir en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1 y el segundo sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2. Dicha entidad puede consistir de manera óptima en un anticuerpo monoclonal biespecífico en el que un sitio de combinación de antígeno reconoce específicamente tanto MASP-1 como MASP-3 y, por lo tanto, bloquea LEA-1, mientras que el segundo sitio de combinación de antígenos reconoce específicamente MASP-2 y bloquea LEA-2 .

El agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse localmente en el ojo, tal como por irrigación o aplicación de la composición en forma de un gel tópico, ungüento o gotas, o por inyección intravítrea. Alternativamente, el agente inhibidor de MASP-2 puede administrarse al sujeto sistémicamente, tal como por administración intraarterial, intravenosa, intramuscular, inhalatoria, nasal, subcutánea u otra parenteral, o potencialmente por administración oral para agentes no peptidérgicos. La administración puede repetirse según lo determine un médico hasta que la condición se haya resuelto o esté controlada.

La aplicación de las composiciones inhibidoras de MASP-3 y/o las composiciones inhibidoras de MASP-2 de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una única administración de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende agentes inhibidores de MASP-2 y/o MASP-3, o agentes inhibidores biespecíficos o dobles, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para tratar, prevenir o reducir la gravedad de BD en un sujeto que la necesite. Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo para el tratamiento de un sujeto que la necesite.

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, se han generado anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que tienen utilidad terapéutica para la inhibición de la vía alternativa en enfermedades o afecciones relacionadas con AP, como la enfermedad de Behçet (BD).

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o tiene riesgo de desarrollar la enfermedad de Behçet (BD) que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno de la misma como se describe en el presente documento que se une a MASP-3 humana e inhibe la activación del complemento de la vía alternativa para tratar o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad de Behçet (BD), tal como, por ejemplo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 86 o la SEQ ID NO: 275 y (iii) VHCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, la SEQ ID NO: 258 o la SEQ ID NO: 259 (ii) VLCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 161.

Agentes inhibidores de MASP-3

Con el reconocimiento de que la vía de la lectina del complemento se compone de dos brazos principales de activación del complemento, LEA-1 y LEA-2, y que también hay un brazo de activación del complemento independiente de la lectina, se da cuenta de que sería altamente deseable específicamente inhibir uno o más de estos brazos efectores que causan una patología asociada con la activación alternativa del complemento de la vía, como al menos uno de hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD, incluida la AMD húmeda y seca), lesión por isquemia-reperfusión , artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (aHUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) o TMA asociada al trasplante), asma, enfermedad de depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple (MS), Síndrome de Guillain Barre, Enfermedad de Alzheimer, Esclerosis lateral amilotrófica (ALS), Nefritis lúpica, Lupus eritematoso sistémico (SLE), Retinopatía diabética, Uveítis, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), Glomerulopatía C3, rechazo de transplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), vasculitis ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis, sin cerrar por completo el sistema inmunitario Capacidades de defensa del complemento (es decir, dejando intacto el camino clásico). Esto dejaría el sistema de activación del complemento dependiente de C1q intacto para manejar el procesamiento del complejo inmune y para ayudar en la defensa del huésped contra la infección.

Composiciones para inhibir la activación del complemento mediada por LEA-1

Como se describe en este documento, los inventores han descubierto inesperadamente que la activación de LEA-1, que conduce a la lisis, es dependiente de MASP-3. Como se describe adicionalmente en el presente documento, en condiciones fisiológicas, la activación de LEA-1 dependiente de MASP-3 también contribuye a la opsonización, proporcionando así un efecto aditivo con la activación del complemento mediada por LEA-2. Como se demuestra aquí, en presencia de Ca^{++}, el factor D no es necesario, ya que MASP-3 puede impulsar la activación de LEA-1 en los sueros del factor $D^{-/-}$. MASP-3, MASP-1 y HTRA-1 pueden convertir el pro-factor D en factor activo D. Del mismo modo, la activación de MASP-3 parece, en muchos casos, depender de MASP-1, ya que MASP-3 (en contraste con MASP-1 y MASP-2) no es una enzima autoactivadora y es incapaz de convertirse en su forma

activa sin la ayuda de MASP-1 (Zundel, S. et al., *J.Immunol*. 172: 4342 -4350 (2004); Megyeri et al., J. Biol. Chem. 288: 8922-8934 (2013). Como MASP-3 no se autoactiva y, en muchos casos, requiere que la actividad de MASP-1 se convierta en su forma enzimáticamente activa, la activación mediada por MASP-3 de la vía alternativa C3 convertasa C3Bb puede inhibirse dirigiéndose al zimógeno MASP-3 o MASP-3 ya activada, o dirigiéndose a la activación de MASP-3 mediada por MASP-1, o ambos, ya que, en muchos casos, en ausencia de actividad funcional de MASP-1, MASP-3 permanece en su forma de zimógeno y no es capaz de conducir la LEA-1 a través de la formación directa de la vía alternativa C3 convertasa (C3bBb).

Por lo tanto, en un aspecto de la invención, el componente proteico preferido para atacar en el desarrollo de agentes terapéuticos para inhibir específicamente la LEA-1 es un inhibidor de MASP-3 (incluidos los inhibidores de la activación de MASP-3 mediada por MASP-1 (por ejemplo, un inhibidor de MASP-1 que inhibe la activación de MASP-3)).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir los efectos adversos de LEA-1 (es decir, hemólisis y opsonización) mediante la administración de un agente inhibidor de MASP-3, como un anticuerpo inhibidor de MASP-3 en un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluida Síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) y púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), asma, enfermedad de depósitos densos, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis de ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un agente inhibidor de MASP-3 eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los agentes inhibidores de MASP-3 se administran en una cantidad eficaz para inhibir la activación del complemento dependiente de MASP-3 en un sujeto vivo que

padece o presenta riesgo de desarrollar hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión , artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluyendo síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmunecrescéntica, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barrera, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis de ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis. En la práctica de este aspecto de la invención, los agentes inhibidores de MASP-3 representativos incluyen: moléculas que inhiben la actividad biológica de MASP-3, incluida moléculas que inhiben al menos uno o más de lo siguiente: activación de lectina dependiente de MASP-3 del factor B, activación de lectina dependiente de MASP-3 de pro-factor D, dependiente de MASP-3, activación de lectina independiente del factor B, y dependiente de MASP-3, activación de lectina independiente de pro-factor D (como inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos contra MASP-3 y fragmentos de los mismos, o péptidos bloqueadores que interactúan con MASP-3 o interfieren con una interacción proteína-proteína), y moléculas que disminuyen la expresión de MASP-3 (como las moléculas de ácido nucleico antisentido de MASP-3, moléculas RNAi específicas de MASP-3 y ribozimas de MASP-3). Un agente inhibidor de MASP-3 puede bloquear eficazmente las interacciones de proteína a proteína de MASP 3 a proteína, interferir con la dimerización o ensamblaje de MASP-3, bloquear el enlace de Ca^{++}, interferir con el sitio activo de la serina proteasa de MASP-3, o reducir la expresión de la proteína de MASP-3, evitando así que MASP-3 active la activación del complemento mediada por LEA-1 o independiente de la lectina, activación de complemento. Los agentes inhibidores de MASP-3 se pueden usar solos como terapia primaria o en combinación con otras terapias como terapia adyuvante para mejorar los beneficios terapéuticos de otros tratamientos médicos, como se describe más adelante en este documento.

Anticuerpos inhibidores de MASP-3 monoclonales de alta afinidad

Como se describe en los Ejemplos 11-21 de este documento, y se resume en las TABLAS 2A, 2B y TABLA 3 a continuación, los inventores han generado anticuerpos

inhibidores de MASP-3 con una afinidad sorprendentemente alta (es decir, ≤500 pM) que se unen a un epítopo en el dominio de la serina proteasa MASP-3 humana. Como se describe en el presente documento, los inventores han demostrado que estos anticuerpos MASP-3 de alta afinidad son capaces de inhibir la activación del complemento de la vía alternativa en suero humano, roedores y primates no humanos. Las regiones variables de cadena ligera y pesada de estos anticuerpos se han secuenciado, aislado y analizado tanto en formato Fab como en formato IgG de longitud completa. Como se describe en el Ejemplo 15 y se muestra en los dendrogramas representados en las FIGURAS 50A y 50B, los anticuerpos se pueden agrupar de acuerdo con la similitud de secuencia. Un resumen de las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera de estos anticuerpos se muestra en las FIGURAS 49A y 49B y se proporciona en las TABLAS 2A y 2B a continuación. Las versiones humanizadas de anticuerpos inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad se generaron como se describe en el Ejemplo 19 y se resumen en la TABLA 3.

TABLA 2A: Secuencias de anticuerpos inhibidores de alta afinidad de MASP-3: parental de ratón

Número de referencia del anticuerpo MASP-3	Grupo	Región Variable de Cadena Pesada (aminoácido)	Región Variable de Cadena Pesada (aminoácido)	Región variable de la cadena pesada (ADN)	Región variable de la cadena ligera (ADN)
4D5	IA	SIN:24	SIN:40	SIN:217	SIN:233
1F3	IA	SIN:25	SIN:41	SIN:218	SIN:234
4B6	IA	SIN:26	SIN:42	SIN:219	SIN:235
1A10	IA	SIN:27	SIN:42	SIN:220	SIN:235
10D12	IB	SIN:28	SIN:43	SIN:221	SIN:236
35C1	IB	SIN:29	SIN:44	SIN:222	SIN:237
13B1	IC	SIN:30	SIN:45	SIN:223	SIN:238
1G4	II	SIN:31	SIN:46	SIN:224	SIN:239
1E7	IIIA	SIN:32	SIN:47	SIN:225	SIN:240
2D7	IIIA	SIN:33	SIN:48	SIN:226	SIN:241
49C11	IIIA	SIN:34	SIN:49	SIN:227	SIN:242
15D9	IIIB	SIN:35	SIN:50	SIN:228	SIN:243
2F5	IIIB	SIN:36	SIN:51	SIN:229	SIN:244
1B11	IIIC	SIN:37	SIN:52	SIN:230	SIN:245
2F2	IIID	SIN:38	SIN:53	SIN:231	SIN:246
11B6	IIID	SIN:39	SIN:54	SIN:232	SIN:247

Nota: "SIN" se refiere a "SEQ ID NO:"

TABLA 2B: Anticuerpos inhibidores de alta afinidad de MASP-3: CDR

Número de referencia de anticuerpos MASP-3	Región Variable de Cadena Pesada	Región Variable de Cadena Ligera	Cadena pesada: CDR1; CDR2;	Cadena de luz: CDR1; CDR2;

	(aminoácido)	(aminoácido)	CDR3 (SEQ ID NOs)	CDR3 (SEQ ID NOs)
4D5	SIN:24	SIN:40	56;58;60	142;144;146
1F3	SIN:25	SIN:41	62;63;65	149;144;146
4B6	SIN:26	SIN:42	62;67;65	149;144;146
1A10	SIN:27	SIN:42	62;69;65	149;144;146
10D12	SIN:28	SIN:43	72;74;76	153;155;157
35C1	SIN:29	SIN:44	79;74;82	159;155;160
13B1	SIN:30	SIN:45	84;86;88	142;144;161
1G4	SIN:31	SIN:46	91;93;95	163;165;167
1E7	SIN:32	SIN:47	109;110;112	182;184;186
2D7	SIN:33	SIN:48	125;127;129	196;198;200
49C11	SIN:34	SIN:49	132;133;135	203;165;204
15D9	SIN:35	SIN:50	137;138;140	206;207;208
2F5	SIN:36	SIN:51	98;99;101	169;171;173
1B11	SIN:37	SIN:52	103;105;107	176;178;180
2F2	SIN:38	SIN:53	114;116;118	188;178;190
11B6	SIN:39	SIN:54	114;121;123	191;178;193

TABLA 3: Anticuerpos inhibidores representativos de alta afinidad de MASP-3: humanizados y modificados para eliminar los sitios de modificación postralacional.

Número de referencia de anticuerpos MASP-3	Región Variable de Cadena Pesada aa (SEQ ID NO)	Región Variable de la Cadena Ligera aa (SEQ ID NO)	Cadena pesada: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NOs)	Cadena de luz: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NOs)
4D5 progenitor	24	40	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1	248	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-19-1	249	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1-NA	248	278	56;58;60	258;144;146
h4D5-19-1-NA	249	278	56;58;60	258;144;146
10D12 progenitor	28	43	72;74;76	153;155;157
h10D12-45-21	251	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-49-21	252	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-45-21-GA	251	279	72;74;76	263;155;157
h10D12-49-21-GA	252	279	72;74;76	263;155;157
13B1 progenitor	30	45	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1	254	256	84;275;88	142;144;161
h13B1-10-1	255	256	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1-NA	254	280	84;275;88	258;144;161
h13B1-10-1-NA	255	280	84;86;88	258;144;161

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se

une específicamente al dominio de serina proteasa de MASP-3 humana (Residuos de aminoácidos 450 a 728 de la SEQ ID NO: 2) con alta afinidad (que tiene una K_D de menos de 500 pM), en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la activación del complemento de la vía alternativa. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad, o su fragmento de unión a antígeno, inhibe la vía alternativa a una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2.5:1 de MASP-3 objetivo a mAb en un sujeto mamífero.

La inhibición de la activación del complemento de la vía alternativa se caracteriza por al menos uno o más de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad de acuerdo con varias realizaciones de la invención: inhibición de la hemólisis y/u opsonización; inhibición de la conversión del factor B independiente de la lectina; inhibición de la conversión independiente de lectina del factor D, inhibición de la escisión específica del sustrato de la serina proteasa MASP-3; la reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b; la reducción de la deposición de Factor B y Bb en una superficie de activación; la reducción de los niveles en reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el Factor D pro; la reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; y/o la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida.

Por ejemplo, como se describe en el presente documento, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos capaces de inhibir la maduración del factor D (es decir, la escisión del pro-factor D al factor D) en un sujeto mamífero. En algunas realizaciones, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad son capaces de inhibir la maduración del factor D en suero completo a un nivel inferior al 50 % del que se encuentra en el suero de control no tratado (como menos del 40 %, por ejemplo menos del 30 %), como menos del 25 %, por ejemplo menos del 20 %, como menos del 15 %, por ejemplo menos del 10%, como menos del 5 % de suero de control no tratado no contactado con un anticuerpo inhibidor de MASP-3).

En realizaciones preferidas, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad inhiben selectivamente la vía alternativa, dejando el sistema de activación del complemento dependiente de C1q funcionalmente intacto.

En otro aspecto, la presente descripción presenta una molécula de ácido nucleico que codifica uno o ambos de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de cualquiera de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 o fragmentos de unión a

antígeno descritos en este documento. También se presenta un vector (por ejemplo, un vector de clonación o expresión) que comprende el ácido nucleico y una célula (por ejemplo, una célula de insecto, célula bacteriana, célula fúngica o célula de mamífero) que comprende el vector. La descripción más adelante proporciona un método para producir cualquiera de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento. Los métodos incluyen el proporcionar una célula que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica uno o ambos de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en este documento. La célula o cultivo de células se cultiva en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la expresión por la célula (o cultivo de células) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo codificado por el ácido nucleico. El método también puede incluir el aislamiento del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula (o cultivo de células) o del medio en el que se cultivaron la célula o células.

Epítopos y péptidos MASP-3

Como se describe en el Ejemplo 18, ilustrado en la FIGURA 62 y resumido en la TABLA 4 a continuación, se encontró que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad y sus fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención reconocen específicamente uno o más epítopos dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3 humana (residuos de aminoácidos 450 a 728 de la SEQ ID NO: 2). "Reconoce específicamente" significa que el anticuerpo se une a dicho epítopo con una afinidad significativamente mayor que a cualquier otra molécula o parte de ella.

TABLA 4: Anticuerpos inhibidores representativos de alta afinidad de MASP-3: regiones de unión a epítopo de MASP-3 (ver también la FIGURA 62)

Fragmentos de unión a péptidos (epítopos) con referencia a MASP-3 humana (con líder)	**Número de referencia MASP-3 mAb**
$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12,
$_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:10)	13B1
$_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
$_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SIN:12)	13B1
$_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
$_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10

$_{498}$VLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:15) Secuencia central del Grupo I	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12, 13B1
$_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SIN:16)	1B11
$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) Secuencia central de los Grupos II y III	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11
$_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SIN 18)	15D9, 2F5
$_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19)	1E7, 2D7, 1G4
$_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20)	15D9, 2F5
$_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SIN:21)	1B11
$_{614}$SDVLQYVKLP$_{623}$ (SIN:22)	1B11
$_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítopo localizado dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3 humana, en donde dicho epítopo se encuentra dentro de al menos uno o más de: VLRSQRRDTTVI (SEQ ID NO: 9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO: 10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO: 11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO. VS. VS. VS. VS. VS. VS. VS. VS. CONTACTO): 14) y / o VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de al menos uno de los SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO: 14.

En otras realizaciones, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítopo localizado dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3 humana, en donde dicho epítopo está ubicado dentro de al menos uno o más de: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID

NO: 16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO: 17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID NO: 18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO: 20); APHMLGL (SEQ ID NO: 21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO: 22); y/o AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 17. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de EHVTVYLGLH (SEQ ID NO: 19) y/o AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO: 23). En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20 y/o la SEQ ID NO: 23. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de al menos una de las SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 21 y/o la SEQ ID NO: 22.

Regiones CDR:

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprende regiones hipervariables específicas, designadas CDR. Preferiblemente, las CDR son CDR de acuerdo con la definición de CDR de Kabat. Las CDR o regiones hipervariables pueden identificarse, por ejemplo, mediante la alineación de secuencias con otros anticuerpos. Las regiones CDR de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad se muestran en las TABLAS 18-23.

mAbs del Grupo IA

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 209 (XXDIN, en la que X en la posición 1 es S o T y en la que X en la posición 2 es N o D); una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, donde X en la posición 7 es G o D; X en la posición 8 es S, T o R; X en la posición 9 es I o T; X en la posición 13 es E o D; X en la posición 14 es K o E, y X en la posición 16 es T o K); y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 211 (XEDXY, donde X en la posición 1 es L o V, y donde X en la posición 4 es T o S); y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, en donde X en la posición 8 es N, I, Q o A; en donde X en la posición 9 es S o T; en la que X en la posición 17 es A o S); una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 144 (WASTRES) y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NUM: 146 (KQSYNLYT). En una realización, la HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 56 (TDDIN). En una realización, la HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 62 (SNDIN). En una realización, la HC-CDR2 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD). En una realización, la HC-CDR2 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a)

comprende la SEQ ID NO: 63 (WIYPRDGSIKYNEKFTD). En una realización, la HC-CDR2 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 67 (WIYPRDGTTKYNEEFTD). En una realización, la HC-CDR2 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 69 (WIYPRDGTTKYNEKFTD). En una realización, la HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 60 (LEDTY). En una realización, la HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 65 (VEDSY). En una realización, la LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); SEQ ID Nº: 257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA), SEQ ID Nº: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); o SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID Nº: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 149 (KSSQSLLISRTRKNYLS).

En una realización, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 56, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 58, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 60 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 142, la SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258 o SEQ ID NO: 259; la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 144 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 146.

En una realización, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 62, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 63, la SEQ ID NO: 67 o la SEQ ID NO: 69, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 65 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 149, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 144 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 146.

mAbs del grupo IB

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 213 (SYGXX, en la que X en la posición 4 es M o I y en la que X en la posición 5 es S o T); una HC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 74; y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 214 (GGXAXDY, donde X en la posición 3 es E o D y en la que X en la posición 5 es M o L); y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 como SEQ ID NO: 215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, en donde X en la posición 10 es D, E o A; en la que X en la posición 11 es G o A y en donde X en la posición 16 es N o S); una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 155; y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 216 (WQGTHFPXT, donde X en la posición 8 es W o Y).

En una realización, la HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con (a) comprende la SEQ ID NO: 72 (SYGMS). En una realización, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 79 (SYGIT). En una realización, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 76 (GGEAMDY). En una realización, la HC-CDR3

comprende la SEQ ID NO: 82 (GGDALDY). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 153 (KSSQSLLDSDGKTYLN); SEQ ID NO: 261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), SEQ ID NO: 262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) o SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 152. En una realización, la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 159 (KSSQSLLDSDGKTYLS).

En una realización, la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 160 (WQGTHFPYT). En una realización, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 72, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 74, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 76 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 153, la SEC. ID NO: 261, SEQ ID NO: 262 o SEQ ID NO: 263; la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 155 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 157.

En una realización, la HC-CDR comprende la SEQ ID NO: 72, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 74, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 76 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 153 o la SEC. ID NO: 263, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 155 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 157.

En una realización, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 79, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 74, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 82 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 159, LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 155 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 160.

mAbs del Grupo IC

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 que comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 84 (GKWIE) ; una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) o SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 88 (SEDV); y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), la SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID Nº: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); o SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 144 (WASTRES); y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT). En una realización, la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 258.

mAbs del Grupo II

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 91 (GYWIE); una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 95 (SIDY); y (b) una

región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), una LC-CDR2 como la SEQ ID NO: 165 (KVSNRFS) y una LC-CDR3 como la SEC. ID NO: 167 (SQSTHVPPT).

mAbs del Grupo III

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 109 (RVHFAIRDTNYWMQ), una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 112 (GSHYFDY); y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1establecida como SEQ ID NO: 182 (RASQSIGTSIH), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 184 (YASESIS) y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 186 (QQSNSWPYT); o

(b) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 125 (DYYMN), una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 129 (CPFYYLGKGTHFDY); y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 196 (RASQDISNFLN), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 198 (YTSRLHS) y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 200 (QQGFTLPWT); o

(c) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 137, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 138, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 140; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 206, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 207 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 208; o

(d) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 98, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 99, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 101; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 169, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 171 y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 173; o

(e) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 103, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 105, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 107; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 176, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 193; o

(f) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 114, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 116, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 118; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 188, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 190; o

(g) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 114, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 121, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 123; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 191, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 193; o

(h) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 132, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 133, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 135; y una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 203, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 165 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 204.

Cadena pesada y regiones variables de cadena ligera

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad que comprende una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: s 24-39, 248-249, 251-252, 254-255 o en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 , SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEC. ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 254 o SEQ ID NO: 255.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad que comprende una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98%, 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: s 40-54, 250, 253, 256, 278, 279 o 280 o en la que el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279 o SEQ ID NO: 280.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 248 o SEQ ID NO: 249 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 250 o SEQ ID NO: 278.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntica a la SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 41.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 26 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 42.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 42.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 251 o SEQ ID NO: 252 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 253 o SEQ ID NO : 279.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 44.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 254 o SEQ ID NO: 255 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 256 o SEQ ID NO : 280.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 46.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera que comprende al al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 47.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 48.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntica a la SEQ ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 49.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 35 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 50.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 51.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 37 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 52.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 38 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 53.

En una realización, el anticuerpo monoclonal MASP-3 comprende una cadena pesada que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que comprende al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 54.

Competencia cruzada de anticuerpos de alta afinidad MASP-3

Como se describe en este documento, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad descritos en este documento reconocen epítopos superpuestos dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3. Como se describe en el Ejemplo 18, que se muestra en las FIGURAS 61A-E y 62-67, y que se resume en las TABLAS 4 y 28, el análisis de competencia cruzada y el análisis de unión de pepscan muestran que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad compiten de forma cruzada y se unen a epítopos localizados dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que reconocen específicamente un epítopo o parte del mismo dentro del dominio de serina proteasa de MASP-3 humana reconocida por uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 24 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 40;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 41;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 26 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 42;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 27 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 42;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 28 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 43;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 44;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 30 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 45;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 46;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 32 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 47;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 48;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 49;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 50;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 36 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 51;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 52;

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 38 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 53; y

un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de cadena pesada como SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera como SEQ ID NO: 54.

De acuerdo con la presente invención, cuando un anticuerpo dado reconoce al menos parte de un epítopo reconocido por otro anticuerpo dado, se dice que estos dos anticuerpos reconocen los mismos epítopos o que se solapan.

Se pueden usar diferentes ensayos disponibles para el experto en la materia para determinar si un anticuerpo (también denominado anticuerpo de prueba) reconoce el mismo epítopo o un superpuesto como un anticuerpo monoclonal particular (también denominado anticuerpo de referencia). Preferiblemente, el ensayo implica los pasos de:

• Proporcionar MASP-3 o un fragmento del mismo que comprenda el epítopo reconocido por el anticuerpo de referencia

• Agregar el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia a dicho MASP-3, donde el anticuerpo de prueba o el anticuerpo de referencia están marcados con una etiqueta detectable. Alternativamente, ambos anticuerpos pueden estar marcados con diferentes marcas detectables.

• Detectando la presencia de la etiqueta detectable en MASP-3.

• Detectando si el anticuerpo de prueba puede desplazar el anticuerpo de referencia.

Si el anticuerpo de referencia se desplaza, el anticuerpo de prueba reconoce el mismo epítopo o un superpuesto como el anticuerpo de referencia. Por lo tanto, si el anticuerpo de referencia está etiquetado con una etiqueta detectable, entonces una señal detectable baja en MASP-3 es indicativa de desplazamiento del anticuerpo de referencia. Si el anticuerpo de prueba está etiquetado con una etiqueta detectable, entonces una señal alta detectable en MASP-3 es indicativa de desplazamiento del anticuerpo de referencia. El fragmento MASP-3 se puede inmovilizar preferiblemente sobre un soporte sólido que permita un manejo fácil. La etiqueta detectable puede ser cualquier etiqueta detectable directa o indirectamente, tal como una enzima, un isótopo radiactivo, un metal pesado, un compuesto coloreado o un compuesto fluorescente. En el Ejemplo 18, en la sección "Análisis de unión de la competencia" a continuación se describe un método ejemplar para determinar si un anticuerpo de prueba reconoce el mismo epítopo o un superpuesto como se describe como un

anticuerpo de referencia. El experto en la materia puede adaptar fácilmente dicho método a los anticuerpos particulares en cuestión.

Los anticuerpos MASP-3 útiles en este aspecto de la invención incluyen anticuerpos monoclonales o recombinantes derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos y pueden ser multiespecíficos (es decir, biespecíficos o triespecíficos), quiméricos, humanizados, completamente humanos, anti idiotipo y fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F $(ab)_2$, F $(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos scFv y anticuerpos monocatenarios como se describe más adelante en este documento.

Los anticuerpos MASP-3 pueden seleccionarse para determinar la capacidad de inhibir el sistema de activación del complemento de la vía alternativa utilizando los ensayos descritos en el presente documento. La inhibición de la activación del complemento de la vía alternativa se caracteriza por al menos uno o más de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad de acuerdo con varias realizaciones de la invención: inhibición de la hemólisis y/u opsonización; inhibición de la conversión del factor B independiente de la lectina; inhibición de la conversión independiente de lectina del factor D, inhibición de la escisión específica del sustrato de la serina proteasa de MASP-3; la reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b; la reducción de la deposición de Factor B y Bb en una superficie de activación; la reducción de los niveles en reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el pro-Factor D; la reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; y/o la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida.

Anticuerpos MASP-3 con función efectora reducida

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad descritos en este documento tienen una función efectora reducida para reducir la inflamación que puede surgir de la activación de la vía clásica del complemento. Se ha demostrado que la capacidad de las moléculas de IgG para desencadenar la vía clásica del complemento reside en la porción Fc de la molécula (Duncan, A.R., et al., *Nature* 332: 738 740 (1988)). Las moléculas de IgG en las que se ha eliminado la porción Fc de la molécula por escisión enzimática carecen de esta función efectora (ver Harlow, *Antibodies*: Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por consiguiente, los anticuerpos con función efectora reducida pueden generarse como resultado de la falta de la porción Fc de la molécula al tener una secuencia Fc modificada por

ingeniería genética que minimiza la función efectora, o ser del isotipo IgG2 o IgG4 humano.

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

Producción de anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad.

Los anticuerpos MASP-3 pueden producirse usando polipéptidos MASP-3 (por ejemplo, MASP-3 de longitud completa) o usando péptidos portadores de epítopos de MASP-3 antigénicos (por ejemplo, una porción del polipéptido MASP-3), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 14 de este documento a continuación. Los péptidos inmunogénicos pueden ser tan pequeños como cinco residuos de aminoácidos. Los péptidos y polipéptidos de MASP-3 utilizados para generar anticuerpos pueden aislarse como polipéptidos naturales, o péptidos recombinantes o sintéticos y polipéptidos recombinantes catalíticamente inactivos. Los antígenos útiles para producir anticuerpos de MASP-3 también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de un polipéptido de MASP-3 o una porción del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción del mismo. Si la porción polipeptídica es similar a un hapteno, dicha porción se puede unir o unir ventajosamente a un portador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

Anticuerpos monoclonicos

Como se usa en el presente documento, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Los anticuerpos

monoclonales se pueden obtener utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo, como el método de hibridoma descrito por Kohler, G., et al., *Nature* 256: 495, (1975), o puede hacerse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567 de Cabilly). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson, T., et al., *Nature* 352: 624 628, (1991), y Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol. 222: 581 597*, (1991). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos.

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

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden obtenerse mediante el uso de ratones transgénicos que han sido diseñados para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina humana en cepas de ratones derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones específicas de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera de la inmunoglobulina endógena. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, como los antígenos MASP-2 descritos en el presente documento, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos de MASP-2 humanos mediante la fusión de células B de dichos animales a líneas celulares de mieloma adecuadas utilizando Kohler convencional. La tecnología de Milstein. Los métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green, L.L., et al., *Nature Genet*. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature* 368: 856, 1994; y Taylor, L.D., et al., *Int. Immun.* 6: 579, 1994.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (ver,

por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1 2.7.12 y páginas 2.9.1 2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG), "in *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, páginas 79 104, 1992).

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

La afinidad de los anticuerpos monoclonales de MASP-3 se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 51: 660 672, 1949). En una realización, los anticuerpos monoclonales de MASP-3 útiles para los métodos de la invención se unen a MASP-3 con una afinidad de unión de <100 nM, preferiblemente <10 nM, preferiblemente <2 nM, y lo más preferiblemente con alta afinidad de <500 pm.

Una vez que se identifican los anticuerpos que se unen específicamente a MASP-3, los anticuerpos de MASP-3 se analizan para determinar su capacidad para funcionar como un inhibidor de la vía alternativa en uno de varios ensayos funcionales, como, por ejemplo, la inhibición de la activación del complemento de la vía alternativa. caracterizado por al menos uno o más de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad de acuerdo con varias realizaciones de la invención: inhibición de la hemólisis y / u opsonización ; inhibición de la conversión del factor B independiente de la lectina; inhibición de la conversión independiente de lectina del factor D, inhibición de la escisión específica del sustrato de la serina proteasa MASP-3; la reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b; la reducción de la deposición

de Factor B y Bb en una superficie de activación; la reducción de los niveles en reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el Factor D pro; la reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; la reducción en la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida; y/o la reducción en la deposición del factor P.

Anticuerpos quiméricos/humanizados

Los anticuerpos monoclonales útiles en el método de la invención incluyen anticuerpos quiméricos en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos (Patente de EE. UU. No. 4,816,567, de Cabilly; y Morrison , SL, y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81: 6851 6855, (1984)).

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

Los anticuerpos humanizados útiles en la invención incluyen anticuerpos monoclonales humanos que incluyen al menos una región CDR3 de unión a MASP-3. Además, las partes Fc pueden reemplazarse para producir IgA o IgM, así como anticuerpos IgG humanos. Dichos anticuerpos humanizados tendrán una utilidad clínica particular porque reconocerán específicamente MASP-3 humana, pero no provocarán una respuesta inmune en humanos contra el propio anticuerpo. En consecuencia, son más adecuados para la administración *in vivo* en humanos, especialmente cuando es necesaria la administración repetida o a largo plazo.

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados también se describen, por ejemplo, por Jones, P. T., et al., *Nature 321*: 522, (1986); Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad Sci. USA* 89: 4285, (1992); Sandhu, J.S., Crit. *Rev. Biotech*. 12: 437, (1992); Singer, I.I., et al., *J. Immun*. 150: 2844, (1993); Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols,* Humana Press, Inc., (1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en *Protein Engineering: Principles and Practice*: *Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., páginas 399 434, (1996); y por la Patente de Estados Unidos Nº 5.693.762, de Queen, 1997. Además, hay entidades comerciales que sintetizarán anticuerpos humanizados de regiones de anticuerpos murinos específicos, como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Anticuerpos recombinantes

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

Fragmentos de inmunoglobulina

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

Se conoce en la técnica que solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está involucrada en la unión del anticuerpo a su epítopo (ver, por ejemplo, Clark, WR, *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectores de la vía

clásica del complemento, pero no están involucradas en la unión del antígeno. Un anticuerpo a partir del cual la región pFc' ha sido escindida enzimáticamente, o que se ha producido sin la región pFc', se designa como un fragmento $F(ab')_2$ y retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento $F(ab')_2$ aislado se denomina fragmento monoclonal bivalente debido a sus dos sitios de unión al antígeno. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual la región Fc ha sido escindida enzimáticamente, o que se ha producido sin la región Fc, se designa como un fragmento Fab y retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por hidrólisis proteolítica, como la digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede realizar utilizando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 4.331.647 de Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biofis* 89: 230, (1960); Porter, R.R., *Biochem. J.* 73: 119, (1959); Edelman, et al., en *Methods in Enzymology* 1: 422, Academic Press, (1967); y por Coligan en las páginas 2.8.1 2.8.10 y 2.10 2.10.4.

En algunas realizaciones, se prefiere el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fc para evitar la activación de la vía clásica del complemento que se inicia al unir Fc al receptor Fcγ. Existen varios métodos mediante los cuales se puede producir un anticuerpo monoclonal que evita las interacciones del receptor Fcγ. Por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo monoclonal puede eliminarse químicamente utilizando la digestión parcial mediante enzimas proteolíticas (como la digestión con ficina), generando así, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, como los fragmentos Fab o $F(ab)_2$ (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol*. 28:69 71, (1991)). Alternativamente, el isotipo de IgG humano γ4, que no se une a los receptores Fcγ, puede usarse durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en el presente documento. Los anticuerpos, anticuerpos de cadena única y dominios de unión a antígeno que carecen del dominio Fc también pueden diseñarse utilizando técnicas recombinantes descritas en este documento.

Fragmentos de anticuerpos de cadena única.

Alternativamente, se pueden crear moléculas de unión a una sola cadena peptídica específicas para MASP-3 en las que las regiones Fv de las cadenas pesada y ligera están conectadas. Los fragmentos Fv se pueden conectar mediante un enlazador peptídico para formar una proteína de unión a antígeno de cadena única (scFv). Estas proteínas de unión a antígeno de cadena única se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped, como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFv se describen, por ejemplo, por Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, (1991); Bird, et al., *Science* 242: 423, (1988); Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778, de Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11: 1271, (1993).

Como ejemplo ilustrativo, se puede obtener un scFv específico de MASP 3 exponiendo linfocitos al polipéptido MASP 3 *in vitro* y seleccionando bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido MASP 3 inmovilizado o etiquetado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen dominios potenciales de unión a polipéptidos de MASP 3 pueden obtenerse seleccionando bibliotecas de péptidos aleatorios mostradas en fagos o en bacterias tales como *E. coli*. Estas bibliotecas de presentación de péptidos al azar se pueden usar para detectar péptidos que interactúan con MASP-3. Las técnicas para crear y seleccionar dichas bibliotecas de presentación de péptidos al azar son bien conocidas en la técnica (Patente de EE. UU. Nº 5.223.409, de Lardner; Patente de EE. UU. Nº 4.946.778, a Ladner; Patente de EE. UU. Nº 5.403.484, a Lardner; Patente de EE. UU. Nº 5.571.698, a Lardner; y Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins*, Academic Press, Inc., 1996) y bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios y los kits para la exploración de dichas bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California), Invitrogen Inc. (San Diego, California), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo MASP-3 útil en este aspecto de la invención es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR) que se une a un epítopo en un antígeno MASP-3 e inhibe la activación de la vía alternativa del complemento.

Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para

sintetizar la región variable a partir del ARN de las células productoras de anticuerpos (ver, por ejemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, (1991); Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), Página 166, Cambridge University Press, (1995) y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, (Eds.), Página 137, Wiley Liss, Inc., 1995).

Los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad descritos en este documento se administran a un sujeto que lo necesita para inhibir la activación de una vía alternativa. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad es un anticuerpo monoclonal MASP-3 humanizado. Opcionalmente con función efectora reducida.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad útiles en el método de la invención abarcan anticuerpos multiespecíficos (es decir, biespecíficos y triespecíficos). Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En una realización, las composiciones y métodos comprenden el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una especificidad de unión para el dominio de serina proteasa de MASP-3 y una especificidad de unión para MASP-2 (por ejemplo, unión a al menos uno de CCP1-CCP2 o serina). dominio de proteasa de MASP-2). En otra realización, el método comprende el uso de un anticuerpo biespecífico que comprende una especificidad de unión para el dominio de serina proteasa de MASP-3 y una especificidad de unión para MASP-1 (por ejemplo, la unión al dominio de serina proteasa de MASP-1). En otra realización, el método comprende el uso de un anticuerpo triespecífico que comprende una especificidad de unión para MASP-3 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de MASP-3), una especificidad de unión para MASP-2 (por ejemplo, unión a al menos uno de CCP1-CCP2 o dominio de serina proteasa de MASP-2) y una especificidad de unión para MASP-1 (por ejemplo, unión al dominio de serina proteasa de MASP-1).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos están dentro del alcance de los expertos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537-539 (1983)). Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio

constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de los métodos ilustrativos actualmente conocidos para generar anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986); WO96 / 27011; Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992); Kostelny y col., *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992); Hollinger et al. *Proc. Natl Acad Sci* USA 90: 6444-6448 (1993); Gruber y col., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994); y Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991). Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y se describen en las patentes de EE.UU. Nº 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

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

También se ha informado sobre otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de una sola cadena (scFv).

(Ver, por ejemplo, Gruber et al. *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en, por ejemplo, Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 (1995). Descrito brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Factor D en tándem (V_H-C_HI-V_H-C_HI) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Los métodos de la invención también abarcan el uso de formas variantes de anticuerpos biespecíficos, tales como las moléculas tetravalentes de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) descritas en Wu et al*., Nat Biotechnol* 25:1290-1297 (2007). Las moléculas de DVD-Ig están diseñadas de manera que dos dominios variables de cadena ligera (VL) diferentes de dos anticuerpos parentales diferentes se unen en tándem directamente o mediante un conector corto mediante técnicas de ADN recombinante, seguidas del dominio constante de cadena ligera. Los métodos para generar moléculas de DVD-Ig a partir de dos anticuerpos parentales se describen adicionalmente, por ejemplo, en los documentos WO08/024188 y WO07/024715, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

XVIII. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y DOSIFICACIÓN DE MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad para inhibir los efectos adversos de la activación del complemento de la vía alternativa en un sujeto que lo necesite, tal como, por ejemplo, un sujeto que padece una enfermedad o afección relacionada con la vía alternativa, como, por ejemplo, una enfermedad hemolítica, como PNH, o una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluida Síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescente necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía, aspiración pulmonar, neumonía por endotiposis, neuromielitis, osteoporosis, esclerosis múltiple (MS), síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Alzheimer, amilotrófica posterior al esclerosis (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerialopatía C3, rechazo al trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodialisis, sepsis, Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis.

Los métodos de este aspecto de la invención comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad eficaz para inhibir la activación del complemento de la vía alternativa y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar una composición que comprende un agente inhibidor de MASP-2. Los anticuerpos inhibidores de MASP 3 de alta afinidad y los agentes inhibidores de MASP-2 pueden administrarse a un sujeto que lo necesite, en dosis terapéuticamente eficaces para tratar o mejorar afecciones asociadas con la activación del complemento de la vía alternativa, y opcionalmente también la activación del complemento dependiente de MASP-2. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad del anticuerpo inhibidor de MASP-3, o una combinación de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 y un agente inhibidor de MASP-2 suficiente para dar como resultado una mejoría de los síntomas de la afección. La inhibición de la activación del complemento de la vía alternativa se caracteriza por al menos uno o más de los siguientes cambios en un componente del sistema del complemento que se produce como resultado de la administración de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad de acuerdo con varias realizaciones de la invención: inhibición de la hemólisis y/u opsonización; inhibición de la conversión del factor B independiente de la lectina; inhibición de la conversión independiente de lectina del factor D, inhibición de la escisión específica del sustrato de la serina proteasa MASP-3; la reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b; la reducción de la deposición de Factor B y Bb en una superficie de activación; la reducción de los niveles en reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el Factor D pro; la reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora; y/o la reducción en la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes inhibidores de MASP 3 y MASP-2 pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares que emplean modelos animales experimentales. Usando tales modelos animales, el NOAEL (nivel de efecto adverso no observado) y el MED (dosis mínimamente efectiva) se pueden determinar usando métodos estándar. La relación de dosis entre los efectos NOAEL y MED es la relación terapéutica, que se expresa como la relación NOAEL / MED. Los agentes inhibidores de MASP 3 y los agentes inhibidores de MASP-2 que exhiben grandes proporciones o índices terapéuticos son los más preferidos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosis del

agente inhibidor de MASP-3 y el agente inhibidor de MASP-2 se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen el MED con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

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

Además de los estudios de toxicidad, la dosis efectiva también puede estimarse en función de la cantidad de proteína MASP objetivo presente en un sujeto vivo y la afinidad de unión del agente inhibidor de MASP-3 o MASP2.

Se ha informado que los niveles de MASP-1 en sujetos humanos normales están presentes en el suero en niveles en el rango de 1.48 a 12.83 µg/mL (Terai I. et al, *Clin Exp Immunol* 110: 317-323 (1997); Theil et al., *Clin. Exp. Immunol.* 169: 38 (2012)). Se ha informado que las concentraciones séricas medias de MASP-3 en sujetos humanos normales se encuentran en el rango de aproximadamente 2.0 a 12.9 µg/ml (Skjoedt M et al., *Immunobiology* 215 (11): 921-31 (2010); Degn et al., *J. Immunol Methods*, 361-37 (2010); Csuka et al., *Mol. Immunol.* 54: 271 (2013). Se ha demostrado que los niveles de MASP-2 en sujetos humanos normales están presentes en el suero en niveles bajos en el rango de 500 ng/ml y los niveles de MASP-2 en un sujeto particular se pueden determinar utilizando un ensayo cuantitativo para MASP-2 descrito en Moller Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods* 282: 159 167 (2003) y Csuka et al., *Mol. Immunol.* 54: 271 (2013).

En general, la dosis de las composiciones administradas que comprenden agentes inhibidores de MASP-3 o agentes inhibidores de MASP-2 varía dependiendo de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, la condición médica general y el historial médico del sujeto. Como ilustración, los agentes inhibidores de MASP-3 o los agentes inhibidores de MASP-2 (como los anticuerpos MASP-3, los anticuerpos MASP-1 o los anticuerpos MASP 2), se pueden administrar en rangos de dosis de aproximadamente 0.010 a 100.0 mg/kg, preferiblemente de 0.010 a 10 mg/kg, preferiblemente de 0.010 a 1.0 mg/kg, más preferiblemente de 0.010 a 0.1 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, los agentes inhibidores de MASP-2 (como los anticuerpos de MASP-2) se administran en intervalos de dosificación de aproximadamente 0.010 a 10 mg/kg, preferiblemente de 0.010 a 1.0 mg/kg, más preferiblemente de 0.010 a 0.1 mg / kg de peso corporal del sujeto. En

algunas realizaciones, los agentes inhibidores de MASP-1 (como los anticuerpos MASP-1) o los agentes inhibidores de MASP-3 (como los anticuerpos MASP-3) se administran en rangos de dosis de aproximadamente 0.010 a 100.0 mg/kg, preferiblemente de 0.010 a 10 mg/kg, tal como la forma de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de 0.010 a 1.0 mg/kg, más preferiblemente de 0.010 a 0.1 mg/kg del peso corporal del sujeto.

La eficacia terapéutica de composiciones inhibidoras de MASP 3, opcionalmente en combinación con composiciones inhibidoras de MASP-2, o de composiciones inhibidoras de MASP-1, opcionalmente en combinación con composiciones inhibidoras de MASP-2, y métodos de la presente invención en un sujeto dado, y dosificaciones apropiadas, puede determinarse de acuerdo con ensayos de complemento bien conocidos por los expertos en la técnica. El complemento genera numerosos productos específicos. Durante la última década, se han desarrollado ensayos sensibles y específicos y están disponibles comercialmente para la mayoría de estos productos de activación, incluidos los pequeños fragmentos de activación C3a, C4a y C5a y los grandes fragmentos de activación iC3b, C4d, Bb y sC5b-9. La mayoría de estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales que reaccionan con nuevos antígenos (neoantígenos) expuestos en el fragmento, pero no en las proteínas nativas a partir de las cuales se forman, lo que hace que estos ensayos sean muy simples y específicos. La mayoría confía en la tecnología ELISA, aunque el radioinmunoensayo todavía se usa a veces para C3a y C5a. Estos últimos ensayos miden tanto los fragmentos no procesados como sus fragmentos "desArg", que son las formas principales encontradas en la circulación. Los fragmentos no procesados y $C5_{adesArg}$ se eliminan rápidamente al unirse a los receptores de la superficie celular y, por lo tanto, están presentes en concentraciones muy bajas, mientras que $C3_{adesArg}$ no se une a las células y se acumula en el plasma. La medición de C3a proporciona un indicador sensible e independiente de la vía de la activación del complemento. La activación de la vía alternativa puede evaluarse midiendo el fragmento Bb y/o midiendo la activación del factor D. La detección del producto en fase fluida de la activación de la vía de ataque de membrana, sC5b-9, proporciona evidencia de que el complemento se está activando hasta su finalización. Debido a que tanto la lectina como las vías clásicas generan los mismos productos de activación, C4a y C4d, la medición de estos dos fragmentos no proporciona ninguna información sobre cuál de estas dos vías ha generado los productos de activación.

La inhibición de la vía alternativa en un sujeto mamífero se caracteriza por al menos uno o más de lo siguiente en el sujeto mamífero después del tratamiento con un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad descrito en el presente documento: inhibición de la maduración del Factor D; inhibición de la vía alternativa

cuando se administra al sujeto en una relación molar de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 2.5: 1 (MASP-3 objetivo a mAb); La vía clásica no está inhibida; inhibición de la hemólisis y / u opsonización; una reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b; una reducción de la deposición de Factor B y Bb en una superficie de activación; una reducción de los niveles de reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el pro-Factor D; una reducción de los niveles del Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie de activación; y / o una reducción de la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida.

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

Portadores farmacéuticos y vehículos de distribución.

En general, las composiciones de anticuerpos inhibidores de MASP-3, o composiciones que comprenden una combinación de MASP-2 y agentes inhibidores de MASP-3, pueden combinarse con cualquier otro agente terapéutico seleccionado, están adecuadamente contenidas en un portador farmacéuticamente aceptable. El portador no es tóxico, es biocompatible y se selecciona para no afectar negativamente la actividad biológica del anticuerpo inhibidor de MASP-3 o el agente inhibidor de MASP-2 (y cualquier otro agente terapéutico combinado con el mismo). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables para péptidos se describen en la patente de EE.UU. nº. 5.211.657 a Yamada. Los anticuerpos MASP-3 útiles en la invención, como se describe en el presente documento, pueden formularse en preparaciones en forma sólida, semisólida, en gel, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, depósitos, inhalantes e inyecciones. Permitiendo la administración oral, parenteral o quirúrgica. La invención también contempla la administración local de las composiciones mediante el revestimiento de dispositivos médicos y similares.

Los portadores adecuados para distribución parenteral mediante inyección inyectable, infusión o irrigación y distribución tópica incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológico, soluciones de Ringer normales o lactadas,

solución de dextrosa, solución de Hank o propanodiol. Además, pueden emplearse aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite biocompatible, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables. El portador y el agente pueden estar compuestos como un líquido, suspensión, gel o pasta polimerizable o no polimerizable.

El portador también puede comprender un vehículo de distribución para sostener (es decir, extender, retrasar o regular) la distribución del (de los) agente (s) o para mejorar la distribución, captación, estabilidad o farmacocinética del(de los) agente(s) terapéutico(s). Dicho vehículo de distribución puede incluir, a modo de ejemplo no limitativo, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles poliméricos o copoliméricos y micelas poliméricas. Los sistemas de distribución de hidrogel y micelas adecuados incluyen los copolímeros de PEO:PHB:PEO y los complejos de copolímero/ciclodextrina descritos en el documento WO 2004/009664 A2 y los complejos de PEO y PEO/ciclodextrina descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles pueden inyectarse localmente en el sitio de la acción prevista, o por vía subcutánea o intramuscular para formar un depósito de liberación sostenida.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para distribución por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial o inhalante.

Para la distribución intraarticular, el anticuerpo inhibidor de MASP-3, opcionalmente en combinación con un agente inhibidor de MASP-2, puede transportarse en portadores líquidos o de gel descritos anteriormente que son inyectables, portadores de distribución de liberación sostenida descritos anteriormente que son inyectables, o un ácido hialurónico o derivado del ácido hialurónico.

Para la administración oral de agentes no peptidérgicos, el anticuerpo inhibidor de MASP-3, opcionalmente en combinación con un agente inhibidor de MASP-2, puede transportarse en un relleno o diluyente inerte tal como sacarosa, almidón de maíz o celulosa.

Para la administración tópica, el anticuerpo inhibidor de MASP-3, opcionalmente en combinación con un agente inhibidor de MASP-2, puede transportarse en ungüento, loción, crema, gel, gota, supositorio, aerosol, líquido o polvo, o en sistemas de distribución de gel o microcapsular mediante un parche transdérmico.

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

Para la distribución intratecal (IT) o intracerebroventricular (ICV), se pueden utilizar sistemas de distribución apropiadamente estériles (por ejemplo, líquidos, geles, suspensiones, etc.) para administrar la presente invención.

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

Portadores farmacéuticos para anticuerpos y péptidos.

Más específicamente con respecto a los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad, como se describe en este documento, las formulaciones ejemplares pueden administrarse por vía parenteral como dosis inyectables de una solución o suspensión del compuesto en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como como el agua, aceites, salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias tamponantes del pH y similares pueden estar presentes en composiciones que comprenden anticuerpos MASP-3. Los componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas incluyen petróleo (tal como de origen animal, vegetal o sintético), por ejemplo, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos para soluciones inyectables.

Los anticuerpos MASP-3 también pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil de los agentes activos.

XVIX. MODOS DE ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos inhibidores de MASP-3, opcionalmente en combinación con agentes inhibidores de MASP-2, pueden administrarse de varias formas dependiendo de si un modo de administración local o sistémica es el más apropiado para la afección que se está tratando. Además, las composiciones de la presente invención pueden administrarse recubriendo o incorporando las composiciones en o en un dispositivo médico implantable.

Distribución sistémica

Tal como se usa en el presente documento, los términos "distribución sistémica" y "administración sistémica" pretenden incluir, entre otros, rutas orales y parenterales que incluyen intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa (IV), intraarterial, inhalatoria, sublingual, bucal, tópica, transdérmica, nasal, rectal, vaginal y otras rutas de administración que dan como resultado la dispersión efectiva del agente administrado a uno o varios sitios de acción terapéutica prevista. Las rutas preferidas de distribución sistémica para las presentes composiciones incluyen la distribución intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial e inhalatoria. Se apreciará que la ruta de administración sistémica exacta para los agentes seleccionados utilizados en composiciones particulares de la presente invención se determinará en parte para tener en cuenta la susceptibilidad del agente a las rutas de transformación metabólica asociadas con una ruta de administración dada. Por ejemplo, los agentes peptidérgicos pueden administrarse más adecuadamente por rutas distintas a la oral.

Los anticuerpos inhibidores de MASP-3, como se describen en este documento, pueden distribuirse a un sujeto que lo necesite por cualquier medio adecuado. Los métodos de distribución de anticuerpos y polipéptidos MASP-3 incluyen la administración por inyección oral, pulmonar, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (tal como a través de una formulación de polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rutas de administración rectal o sublingual, y pueden formularse en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración.

A modo de ejemplo representativo, los anticuerpos y péptidos inhibidores de MASP-3 pueden introducirse en un cuerpo vivo mediante la aplicación a una membrana corporal capaz de absorber los polipéptidos, por ejemplo, las membranas nasales, gastrointestinales y rectales. Los polipéptidos se aplican típicamente a la membrana absorbente junto con un potenciador de la permeación. (Ver, por ejemplo, Lee, VHL, *Crit. Rev*. *Ther. Drug Carrier Sys*. 5:69, (1988); Lee, VHL, *J. Controlled Release* 13: 213, (1990); Lee, VHL, Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery*, Marcel Dekker, Nueva York (1991); DeBoer, AG, et al., *J. Controlled Release* 13: 241, (1990). Por ejemplo, STDHF es un derivado sintético del ácido fusídico, un agente tensioactivo esteroideo es similar en estructura a las sales biliares, y se ha utilizado como un potenciador de la permeación para la distribución nasal (Lee, WA, *Biopharm*. 22, noviembre y diciembre de 1990).

Los anticuerpos inhibidores de MASP-3 como se describen en el presente documento pueden introducirse en asociación con otra molécula, tal como un lípido, para proteger a los polipéptidos de la degradación enzimática. Por ejemplo, la unión covalente de polímeros, especialmente polietilenglicol (PEG), se ha utilizado para

proteger ciertas proteínas de la hidrólisis enzimática en el cuerpo y así prolongar la vida media (Fuertges, F., et al., J. *Controlled Release* 11: 139, (1990)). Se han informado muchos sistemas de polímeros para la distribución de proteínas (Bae, YH, et al., J. *Controlled Release* 9: 271, (1989); Hori, R., et al., Pharm. Res. 6: 813, (1989) Yamakawa, I. et al., *J. Pharm. Sci.* 79: 505, (1990); Yoshihiro, I. et al,, *J. Controlled Release* 10: 195, (1989); Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9: 111, (1989); Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9: 195, (1989); Makino, K., *J. Controlled Release* 12: 235, (1990); Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78: 117, (1989); Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78: 219, (1989)).

Recientemente, se han desarrollado liposomas con una mejor estabilidad del suero y medios tiempos de circulación (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.741.516 de Webb). Además, se han revisado diversos métodos de liposomas y preparaciones similares a liposomas como posibles portadores de fármacos (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.567.434, de Szoka; Patente de Estados Unidos Nº 5.552.157, de Yagi; Patente de Estados Unidos Nº 5.565.213, de Nakamori; Estados Unidos La Patente No. 5,738,868, de Shinkarenko, y la Patente de los Estados Unidos No. 5,795,587, de Gao).

Para aplicaciones transdérmicas, los anticuerpos inhibidores de MASP-3, como se describen en este documento, pueden combinarse con otros ingredientes adecuados, tales como portadores y/o adyuvantes. No hay limitaciones sobre la naturaleza de tales otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables para su administración prevista y no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Los anticuerpos inhibidores de MASP-3 también pueden impregnarse en parches transdérmicos, emplastos y vendajes, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse sistémicamente de forma periódica a intervalos determinados para mantener un nivel deseado de efecto terapéutico. Por ejemplo, pueden administrarse composiciones, tales como por inyección subcutánea, cada dos a cuatro semanas o en intervalos menos frecuentes. El médico determinará el régimen de dosificación considerando varios factores que pueden influir en la acción de la combinación de agentes. Estos factores incluirán la extensión del progreso de la afección que se está tratando, la edad, el sexo y el peso del paciente, y otros factores clínicos. La dosis para cada agente individual variará en función del anticuerpo inhibidor de MASP-3 o el agente inhibidor de MASP-2 que se incluye en la composición, así como la presencia y naturaleza de cualquier vehículo de distribución de medicamentos (por ejemplo, un

vehículo de distribución de liberación sostenida). Además, la cantidad de dosis se puede ajustar para tener en cuenta la variación en la frecuencia de administración y el comportamiento farmacocinético del agente o agentes administrados.

Distribución local

Como se usa en este documento, el término "local" abarca la aplicación de un medicamento en o alrededor de un sitio de acción localizada prevista, y puede incluir, por ejemplo, distribución tópica a la piel u otros tejidos afectados, distribución oftálmica, intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), intraarticular, intracavidad, intracraneal o intravesicular, colocación o irrigación. Se puede preferir la administración local para permitir la administración de una dosis más baja, para evitar los efectos secundarios sistémicos y para un control más preciso del tiempo de distribución y la concentración de los agentes activos en el lugar de la distribución local. La administración local proporciona una concentración conocida en el sitio objetivo, independientemente de la variabilidad entre pacientes en el metabolismo, el flujo sanguíneo, etc. El modo directo de distribución también proporciona un mejor control de la dosis.

La distribución local de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 o un agente inhibidor de MASP 2 se puede lograr en el contexto de los métodos quirúrgicos para tratar una enfermedad o afección, como por ejemplo durante procedimientos como la cirugía de bypass arterial, aterectomía, procedimientos con láser, procedimientos ultrasónicos, balón de angioplastia y colocación de stent. Por ejemplo, se puede administrar un anticuerpo inhibidor de MASP-3 o un agente inhibidor de MASP2 a un sujeto junto con un procedimiento de angioplastia con balón. Un procedimiento de angioplastia con balón implica la inserción de un catéter que tiene un balón desinflado en una arteria. El balón desinflado se coloca cerca de la placa aterosclerótica y se infla de manera que la placa se comprima contra la pared vascular. Como resultado, la superficie del balón está en contacto con la capa de células endoteliales vasculares en la superficie del vaso sanguíneo. El anticuerpo inhibidor de MASP-3 o el agente inhibidor de MASP-2 pueden unirse al catéter de angioplastia con balón de una manera que permita la liberación del agente en el sitio de la placa aterosclerótica. El agente puede unirse al catéter de balón de acuerdo con los procedimientos estándares conocidos en la técnica. Por ejemplo, el agente puede almacenarse en un compartimiento del catéter con balón hasta que el balón se infle, en cuyo punto se libera en el entorno local. Alternativamente, el agente puede impregnarse en la superficie del balón, de modo que contacte con las células de la pared arterial cuando el balón se infle. El agente también puede distribuirse en un catéter de balón perforado como los descritos en Flugelman, M.Y., et al., *Circulation* 85:1110-1117, (1992). Ver también la Solicitud PCT publicada WO 95/23161 para un procedimiento

ejemplar para unir una proteína terapéutica a un catéter de angioplastia con balón. Del mismo modo, el agente inhibidor de MASP-3 o el agente inhibidor de MASP 2 puede incluirse en un gel o recubrimiento polimérico aplicado a un stent, o puede incorporarse en el material del stent, de modo que el stent eluya el agente inhibidor de MASP-3 o agente inhibidor de MASP 2 después de la colocación vascular.

Los anticuerpos inhibidores de MASP-3 utilizados en el tratamiento de artritis y otros trastornos musculoesqueléticos pueden distribuirse localmente mediante inyección intraarticular. Tales composiciones pueden incluir adecuadamente un vehículo de liberación sostenida. Como un ejemplo adicional de los casos en los que puede desearse la distribución local, las composiciones inhibidoras de MASP3 usadas en el tratamiento de afecciones urogenitales pueden instilarse adecuadamente por vía intravesical o dentro de otra estructura urogenital.

XX. RÉGIMEN DE TRATAMIENTO

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto susceptible a, o de lo contrario, en riesgo de, una enfermedad o trastorno asociado a la vía alternativa, por ejemplo, una enfermedad o trastorno de la vía alternativa seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) y púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo al trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, Aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo de desarrollar síntomas de la afección. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto sospechoso o que ya padece una enfermedad o trastorno relacionado con la vía alternativa, como una enfermedad o un trastorno de la vía alternativa seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), degeneración macular relacionada con

la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), asma, enfermedad de depósitos densos, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica, enfermedad de Behcet, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, Aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis, en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para aliviar, o al menos reducir parcialmente, los síntomas de la afección.

En una realización, la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad se administra a un sujeto que padece o está en riesgo de desarrollar PNH. De acuerdo con esto, los glóbulos rojos del sujeto se opsonizan con fragmentos de C3 en ausencia de la composición, y la administración de la composición al sujeto aumenta la supervivencia de los glóbulos rojos en el sujeto. En una realización, el sujeto muestra uno o más síntomas en ausencia de la composición seleccionada del grupo que consiste en (i) niveles de hemoglobina por debajo de lo normal, (ii) niveles de plaquetas por debajo de lo normal; (iii) niveles de reticulocitos por encima de lo normal, y (iv) niveles de bilirrubina por encima de lo normal, y la administración de la composición al sujeto mejora al menos uno o más de los síntomas, lo que resulta en (i) niveles aumentados, normales o casi normales de hemoglobina (ii) niveles aumentados, normales o casi normales de plaquetas, (iii) niveles disminuidos, normales o casi normales de reticulocitos, y / o (iv) niveles disminuidos, normales o casi normales de bilirrubina.

Tanto en los regímenes profilácticos como terapéuticos para el tratamiento, la prevención o la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluyendo síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome hemolítico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica, enfermedad de Behcetcrescéntica, que comprenden anticuerpos

inhibidores de MASP-3 de alta afinidad y opcionalmente agentes inhibidores de MASP2, pueden administrarse en varias dosis hasta que se logre un resultado terapéutico suficiente en el sujeto. En una realización de la invención, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y/o el agente inhibidor de MASP-2 se pueden administrar a un paciente adulto (por ejemplo, un peso promedio de un adulto de 70 kg) en una dosis de 0.1 mg a 10000 mg, más adecuadamente de 1.0 mg a 5,000 mg, más adecuadamente de 10.0 mg a 2,000 mg, más adecuadamente de 10.0 mg a 1,000 mg y aún más adecuadamente de 50.0 mg a 500 mg, o de 10 a 200 mg. Para los pacientes pediátricos, la dosis se puede ajustar en proporción al peso del paciente.

La aplicación de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad y las composiciones inhibidoras de MASP2 opcionales de la presente invención se puede llevar a cabo mediante una administración única de la composición (por ejemplo, una composición única que comprende MASP-3 y opcionalmente agentes inhibidores de MASP-2, o agentes biespecíficos o inhibidores duales, o administración conjunta de composiciones separadas), o una secuencia limitada de administraciones, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la vía alternativa, como una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aUSH) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad de depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis optica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barré, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, arteriopatía IgA, nefropatía IgA y miastenia gravis.

Alternativamente, la composición puede administrarse a intervalos periódicos tales como diario, quincenal, semanal, cada dos semanas, mensual o bimestral durante un período prolongado de tiempo según lo determine un médico para un efecto terapéutico óptimo.

En algunas realizaciones, una primera composición que comprende al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y una segunda composición que

comprende al menos un agente inhibidor de MASP-2 se administra a un sujeto que padece, o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome hemicítico atípico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, Síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, injerto contra la enfermedad GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis.

En una realización, la primera composición que comprende al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de MASP-2 se administran simultáneamente (es decir, dentro de un tiempo de separación de no más de aproximadamente 15 minutos o menos), como no más de 10, 5 o 1 minuto). En una realización, la primera composición que comprende al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de MASP-2 se administran secuencialmente (es decir, la primera composición se administra antes o después de la administración de la segunda composición, en la que el tiempo de separación de la administración es de más de 15 minutos). En algunas realizaciones, la primera composición que comprende al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y una segunda composición que comprende al menos un agente inhibidor de MASP-2 se administran simultáneamente (es decir, el período de administración de la primera composición se superpone con la administración de la segunda composición). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la primera composición y/o la segunda composición se administran durante un período de al menos una, dos, tres o cuatro semanas o más. En una realización, al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y al menos un agente inhibidor de MASP-2 se combinan en una forma de dosificación unitaria. En una realización, una primera composición que comprende al menos un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y una segunda composición que comprende al

menos un agente inhibidor de MASP-2 se empaquetan juntas en un kit para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con la vía alternativa, como hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, Síndrome de Guillain-Barré,enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA o miastenia gravis.

En algunas realizaciones, el sujeto padece PNH, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), asma, enfermedad por depósito denso, glomerulonefritis crescéntica necrotizante pauci-inmune, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, Síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo al trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), hemodiálisis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), vasculitis por ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia gravis se han sometido previamente, o se están sometiendo actualmente a un tratamiento con un inhibidor del complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína C5 del complemento. En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una composición de la invención que comprende un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad y opcionalmente un inhibidor de MASP-2 y además administrar al sujeto un inhibidor del complemento terminal que inhibe la escisión de la proteína del complemento C5. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento terminal es

un anticuerpo anti-C5 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento terminal es eculizumab.

XXI . EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran el mejor modo ahora contemplado para la práctica de la invención, pero no deben interpretarse para limitar la invención. Todas las citas bibliográficas en este documento se incorporan expresamente como referencia.

EJEMPLO 1

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

Métodos:

Los ratones knockout MASP-2 (ratones MASP-2 KO) se generaron como se describe en el Ejemplo 1 del documento US 7.919.094, que se incorpora al presente documento como referencia. Se inocularon ratones MASP-2 KO de 10 semanas de edad (n = 10) y ratones de tipo natural (WT) C57/BL6 (n = 10) mediante inyección intraperitoneal (ip) con una dosis de 2.6 x 10^7 UFC de serogrupo A Z2491 de *N. meningitidis* en un volumen de 100 µl. La dosis infecciosa se administró a ratones junto con hierro dextrano a una concentración final de 400 mg/kg. La supervivencia de los ratones después de la infección se controló durante un período de tiempo de 72 horas.

En un experimento separado, los ratones MASP-2 KO de 10 semanas de edad (n = 10) y los ratones WT C57/BL6 (n = 10) se inocularon mediante inyección i.p. con una dosis de 6 x 10^6 UFC de serogrupo B cepa MC58 de *N. meningitidis* en un volumen de 100 µL. La dosis infecciosa se administró a ratones junto con hierro dextrano a una dosis final de 400 mg/kg. La supervivencia de los ratones después de la infección se controló durante un período de tiempo de 72 horas. También se determinó un puntaje de enfermedad para los ratones WT y MASP-2 KO durante el período de tiempo de 72 horas después de la infección, según los parámetros de puntuación de la enfermedad que se describen a continuación en la **TABLA 5**, que se basa en el esquema de Fransen et al. (2010) con ligeras modificaciones.

TABLA 5: Puntuación de enfermedad asociada con signos clínicos en ratones infectados

Señales	**Puntuación**
Normal	0
Piel ligeramente rizada.	1

Piel rizada, ojos lentos y pegajosos.	2
Pelaje rizado, letárgico y ojos cerrados.	3
Muy enfermo y sin movimiento después de la estimulación.	4
Muerto	5

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

Resultados:

La **FIGURA 6** es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de 2.6 x 10^7 ufc de serogrupo A Z2491de *N. meningitidis*. Como se muestra en la **FIGURA 6**, el 100 % de los ratones MASP-2 KO sobrevivieron durante las 72 horas posteriores a la infección. En contraste, solo el 80 % de los ratones WT (p = 0.012) seguían vivos 24 horas después de la infección, y solo el 50 % de los ratones WT seguían vivos 72 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones deficientes en MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por serogrupo A Z2491 de *N. meningitidis*.

La **FIGURA 7** es una gráfica de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones MASP-2 KO y WT después de la administración de una dosis infecciosa de 6 x 10^6 ufc de la cepa MC58 del serogrupo N. de *N. meningitidis*. Como se muestra en la **FIGURA 7**, el 90 % de los ratones MASP-2 KO sobrevivieron durante las 72 horas posteriores a la infección. En contraste, solo el 20 % de los ratones WT (p = 0,0022) estaban vivos 24 horas después de la infección. Estos resultados demuestran que los ratones deficientes en MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por la cepa MC58 del serogrupo B de N. meningitidis.

La **FIGURA 8** ilustra gráficamente el log ufc/mL de la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis* recuperado en diferentes puntos de tiempo en muestras de sangre tomadas de ratones MASP-2 KO y WT después de i.p. infección con 6x10^6 ufc de la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis* (n = 3 en diferentes puntos de tiempo para ambos grupos de ratones). Los resultados se expresan como Medias±SEM. Como se muestra en la **FIGURA 8**, en ratones WT, el nivel de *N. meningitidis* en la sangre alcanzó un máximo de aproximadamente 6.0 log ufc/mL a las 24 horas después de la infección y disminuyó a aproximadamente 4.0 log ufc/mL a las 36 horas después de la infección. En contraste, en los ratones MASP-2 KO, el nivel de *N. meningitidis* alcanzó un pico de aproximadamente 4.0 log ufc/mL a 12 horas después de la infección y se redujo a aproximadamente 1.0 log ufc/mL a 36 horas después de la infección (el símbolo "*" indica p <0.05; el símbolo "**" indica

p = 0.0043). Estos resultados demuestran que aunque los ratones MASP-2 KO se infectaron con la misma dosis de la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis* que los ratones WT, los ratones KO MASP-2 han mejorado la eliminación de la bacteriemia en comparación con WT.

La **FIGURA 9** ilustra gráficamente el puntaje promedio de enfermedad de los ratones MASP-2 KO y WT a las 3, 6, 12 y 24 horas después de la infección con $6x10^6$ ufc de la cepa MC58 del serogrupo N. de *N. meningitidis*. Como se muestra en la **FIGURA 9,** los ratones deficientes en MASP-2 mostraron una alta resistencia a la infección, con puntuaciones de enfermedad mucho más bajas a las 6 horas (el símbolo "*" indica *p* = 0.0411), 12 horas (el símbolo "**" indica *p* = 0.0049) y 24 horas (el símbolo "***" indica *p* = 0.0049) después de la infección, en comparación con los ratones WT. Los resultados en la **FIGURA 9** se expresan como medias±SEM.

En resumen, los resultados en este Ejemplo demuestran que los ratones deficientes en MASP-2 están protegidos de la mortalidad inducida por *N. meningitides* después de la infección con el serogrupo A de *N. meningitidis* o el serogrupo B de N. meningitidis.

EJEMPLO 2

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

Antecedentes / Justificación:

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

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

Métodos:

El isotipo de anticuerpos completos MASP-2 de ratón IgG2a a partir de Fab2 #11, generado como se describió anteriormente, se probó en el modelo de ratón de la infección por *N. meningitidis* de la siguiente manera.

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

Los ratones de Charles River C57/BL6 de 9 semanas de edad fueron tratados con anticuerpos inhibidores MASP-2 de ratón (1.0 mg/kg) (n=12) o anticuerpos de control de isotipo (n=10) a las 3 horas después de la inyección i.p. con una dosis alta ($4x10^6$ ufc) de la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis*.

Resultados:

La **FIGURA 10** es un gráfico de Kaplan-Meyer que ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de ratones después de la administración de una dosis infecciosa de $4x10^6$ ufc de la cepa MC58 del serogrupo B de *N. meningitidis*, seguida de la administración de 3 horas después de la infección, ya sea del anticuerpo inhibidor MASP-2 (1,0 mg/kg) o del control de isotipo. Como se muestra en la **FIGURA 10**, el 90 % de los ratones tratados con anticuerpos MASP-2 sobrevivieron durante las 72 horas posteriores a la infección. En contraste, sólo el 50 % de los ratones tratados con anticuerpos de control de isotipo sobrevivieron durante el período de 72 horas después de la infección. El símbolo "*" indica p=0,0301, determinado por la comparación de las dos curvas de supervivencia.

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

Como se ha demostrado aquí, el uso de anticuerpos MASP-2 en el tratamiento de un sujeto infectado con *N. meningitidis* es efectivo cuando se administra dentro de las 3 horas posteriores a la infección, y se espera que sea efectivo dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la infección. La enfermedad meningocócica (ya sea meningococcemia o meningitis) es una emergencia médica, y por lo general la terapia se iniciará inmediatamente si se sospecha que existe la enfermedad meningocócica (es decir, antes de que N. meningitidis sea identificada positivamente como el agente etiológico).

En vista de los resultados en el ratón MASP-2 KO demostrados en el EJEMPLO 1, se cree que la administración de anticuerpos MASP-2 antes de la infección con N. meningitidis también sería efectiva para prevenir o mejorar la gravedad de la infección.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra que la mortalidad del complemento dependiente de *N. meningitidis* en sueros humanos es dependiente de MASP-3.

Justificación:

Los pacientes con niveles séricos reducidos de lectina de unión a manosa (MBL) funcional muestran una mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002)).

Se sabe que *N. meningitidis* es reconocida por la MBL, y se ha demostrado que los sueros deficientes en MBL no lisan *N. meningitidis*.

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

Métodos:

1. Actividad bactericida sérica en diversos sueros humanos deficientes en complementos y en sueros humanos tratados con anticuerpos MASP-2 humanos

En este experimento se utilizaron los siguientes sueros humanos deficientes en complementos y sueros humanos de control:

TABLA 6: Muestras de suero humano analizadas (como se muestra en la FIGURA 11)

Muestra	Tipo de suero
A	Suero humano normal (NHS) + MASP-2 Ab humano
B	NHS + control de isotipo Ab
C	MBL -/- suero humano
D	NHS
E	Inactivado por calor (HI) NHS

Se aisló un anticuerpo recombinante contra MASP-2 humana de una biblioteca combinatoria de anticuerpos (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000)), usando MASP-2A humana recombinante como antígeno (Chen, C.B. y Wallis, J. *Biol. Chem*. 276:25894-25902 (2001)). Se identificó un fragmento scFv antihumano que inhibía potentemente la activación mediada por la vía de la lectina de C4 y C3 en el plasma humano (IC_{50}~20 nM) y se convirtió en un anticuerpo humano completo IgG4.

El serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* se incubó con los diferentes sueros de la **TABLA 6,** cada uno con una concentración sérica del 20 %, con o sin la adición de anticuerpos inhibidores MASP-2 humanas (3 µg en un volumen total de 100 µl) a 37°C con agitación. Las muestras se tomaron en los siguientes intervalos de tiempo: Se determinaron los intervalos de 0, 30, 60 y 90 minutos, se colocaron en placas y luego se determinaron los recuentos viables. Se utilizó suero humano inactivado por calor como control negativo.

Resultados:

La **FIGURA 11** ilustra gráficamente el log ufc/mL de los recuentos viables de *N. meningitidis* del serogrupo B-MC58 recuperados en diferentes intervalos de tiempo

en las muestras de sueros humanos que se muestran en la **TABLA 6.** La **TABLA 7** proporciona los resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 11**.

TABLA 7: Resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 11** (intervalo de tiempo 60 minutos)

	Diferencia media (Log)	**¿Significativo? ¿P<0.05?**	**Resumen del valor P**
A vs B	-0.3678	Sí	***(0.0002)
A vs C	-1.1053	Sí	***(p<0.0001)
A vs D	-0.2111	Sí	**(0.0012)
C vs D	1.9	Sí	***(p<0.0001)

Como se muestra en la **FIGURA 11** y en la **TABLA 7**, la destrucción dependiente del complemento de *N. meningitidis* en el suero humano al 20 % fue significativamente mejorada por la adición del anticuerpo inhibidor MASP-2 humana.

2. Actividad bactericida sérica en diversos sueros humanos deficientes en complementos

En este experimento se utilizaron los siguientes sueros humanos deficientes en complementos y sueros humanos de control:

TABLA 8: Muestras de suero humano analizadas (como se muestra en la **FIGURA 12**)

Muestra	**Tipo de suero**
A	Suero humano normal (NHS)
B	Inactivado por calor NHS
C	MBL -/-
D	MASP-3 -/- (MASP-1 +)

Nota: El suero MASP-3 -/- (MASP-1+) en la muestra D fue tomado de un sujeto con síndrome de 3MC, que es un término unificador para los síndromes de Carnevale, Mingarelli, Malpuech y Michels superpuestos. Como se describe más adelante en el Ejemplo 4, las mutaciones en el exón 12 del gen MASP-1/3 hacen que el dominio de la proteasa serina del MASP-3, pero no MASP-1, sea disfuncional. Como se describe en el ejemplo 10, el pro-factor D está presente preferentemente en el suero de 3MC, mientras que el factor D activado está presente preferentemente en el suero humano normal.

El serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* fue incubado con diferentes sueros humanos deficientes en complementos, cada uno a una concentración sérica del 20

%, a 37°C con agitación. Las muestras se tomaron en los siguientes intervalos de tiempo: Se determinaron los intervalos de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, se colocaron en placas y luego se determinaron los recuentos viables. Se utilizó suero humano inactivado por calor como control negativo.

Resultados:

La **FIGURA 12** ilustra gráficamente el log ufc/mL de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* recuperados en diferentes intervalos de tiempo en las muestras de sueros humanos que se muestran en la **TABLA 8**. Como se muestra en la **FIGURA 12**, el suero WT (NHS) tiene el nivel más alto de actividad bactericida para *N. meningitidis*. Por el contrario, los sueros humanos MBL -/- y MASP-3 -/- (el cual es suficiente en MASP-1) no tienen actividad bactericida. Estos resultados indican que la destrucción de *N. meningitidis* en el suero humano al 20 % (v/v) depende de los complementos: MASP-3 y MBL. La **TABLA 9** proporciona los resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 12**.

TABLA 9: Resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 12**

Comparación	Intervalo de tiempo (min)	Diferencia media (Log)	¿Significativo? ¿P<0.05?	Resumen del valor P
A vs B	60	-0.8325	Sí	***(p<0.0001)
A vs B	90	-1.600	Sí	***(p<0.0001)
A vs C	60	-1.1489	Sí	***(p<0.0001)
A vs C	90	-1.822	Sí	***(p<0.0001)
A vs D	60	-1.323	Sí	***(0.0005)
A vs D	90	-2.185	Sí	***(p<0.0001)

En resumen, los resultados mostrados en la **FIGURA 12** y en la **TABLA 9** demuestran que la destrucción de *N. meningitidis* en un 20 % del suero humano depende de los complementos de MASP-3 y MBL.

3. Destrucción dependiente del complemento de *N. meningitidis* en un 20 % (v/v) de sueros de ratón deficientes de MASP-2, MASP-1/3 o MBL A/C.

En este experimento se utilizaron los siguientes sueros de ratón deficientes en complementos y sueros de ratón de control:

TABLA 10: Muestras de suero de ratón analizadas (como se muestra en la **FIGURA 13**)

Muestra	Tipo de suero
A	WT

B	MASP-2 -/-
C	MASP-1/3 -/-
D	MBL A/C -/-
E	WT inactivado por calor (HIS)

El serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* se incubó con diferentes sueros de ratón deficientes en complementos, cada uno a una concentración sérica de 20 %, a 37°C con agitación. Las muestras se tomaron en los siguientes intervalos de tiempo: Se determinaron los intervalos de 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, y luego se determinaron los recuentos viables. Se utilizó suero humano inactivado por calor como control negativo.

Resultados:

La **FIGURA 13** ilustra gráficamente el log ufc/mL de los recuentos viables del serogrupo B-MC58 de *N. meningitidis* recuperados en diferentes intervalos de tiempo en las muestras de suero de ratón mostradas en la **TABLA 10**. Como se muestra en la **FIGURA 13**, los sueros MASP-2 -/- de ratón tienen un nivel más alto de actividad bactericida para *N. meningitidis* que los sueros de ratón WT. Por el contrario, los sueros MASP-1/3 -/- no tienen actividad bactericida. El símbolo "**" indica p=0,0058, el símbolo "***" indica p=0,001. La **TABLA 11** proporciona los resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 13**.

TABLA 11: Resultados de la prueba t de Student para la **FIGURA 13**

Comparación	Intervalo de tiempo	Diferencia media (LOG)	¿Significativo? ¿P<0.05?	Resumen del valor P
A vs B	60 min.	0.39	Sí	**(0.0058)
A vs B	90 min.	0.6741	Sí	***(0.001)

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

EJEMPLO 4

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

Justificación:

Para determinar el mecanismo de resistencia dependiente del MASP-3 a la infección por *N. meningitidis* observado en ratones MASP-2 KO (descrito en los

Ejemplos 1-3 anteriores), se realizó una serie de experimentos de la siguiente manera.

1. Los ratones con deficiencia de MASP-1/3 no son deficientes en la actividad funcional de la vía de la lectina (también conocida como "LEA-2").

Métodos:

Para determinar si los ratones con deficiencia de MASP-1/3 son deficientes en la actividad funcional de la vía de la lectina (también conocida como LEA-2), se realizó un ensayo para medir la cinética de la actividad de la convertasa C3 en el plasma a partir de varias cepas de ratón con deficiencia de complementos probadas en condiciones específicas de la vía de activación de la lectina (1 % de plasma), como se describe en Schwaeble W. et al., *PNAS* vol 108(18):7523-7528 (2011), que se incorporan a este documento como referencia.

El plasma se probó en ratones WT, C4-/-, MASP-1/3-/-; Factor B-/- y MASP-2-/- de la siguiente manera.

Para medir la activación de C3, las placas de microtitulación se recubrieron con manano (1 µg/pocillo), zimosán (1 µg/pocillo) en tampón de recubrimiento (15 mM Na_2Co_3, 35 mM $NaHCO_3$), o complejos inmunes, generados in situ mediante el recubrimiento con 1 % de albúmina de suero humano (HSA) en tampón de recubrimiento, y luego se agregó suero anti-HAS de oveja (2 µg/mL) en el TBS (10mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4) con 0.05 % de Tween 20 y 5 mM Ca^{++}. Las placas fueron bloqueadas con 0.1 % de HSA en TBS y lavadas tres veces con TBS/Tween20/Ca^{++}. Las muestras de plasma se diluyeron en 4 mM de barbital, 145 mM de NaCl, 2 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$, pH 7.4, se añadieron a las placas y se incubaron durante 1.5 h a 37°C. Después del lavado, se detectó C3b ligado utilizando C3c (Dako) antihumano de conejo, seguido de IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina y fosfato de p-nitrofenilo.

Resultados:

La cinética de la activación de C3 (medida por la deposición de C3b en placas recubiertas de manano con suero al 1 %) bajo condiciones específicas de la vía de la lectina se muestra en la **FIGURA 14**. No se observó ninguna escisión de C3 en el plasma MASP-2-/-. El plasma del factor B-/- (factor B -/-) dividió a C3 a la mitad de la velocidad del plasma WT, probablemente debido a la pérdida del bucle de amplificación. Un retraso significativo en la conversión de C3 a C3b dependiente de la vía de la lectina se observó en el plasma deficiente en C4-//- ($T_{1/2}$=33min) así como en el MASP-1/3-/- ($T_{1/2}$=49 min). Este retardo de activación de C3 en el plasma MASP-1/3-/- se ha demostrado que depende de MASP-1- en lugar de MASP-3. (Ver Takahashi M. et al., *J Immunol* 180:6132-6138 (2008)). Estos resultados demuestran

que los ratones con deficiencia de MASP-1/3 no son deficientes en la actividad funcional de la vía de la lectina (también conocida como "LEA-2").

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

Justificación:

El efecto de la deficiencia hereditaria de MASP-3 sobre la activación de la vía alternativa se determinó probando el suero de un paciente deficiente de MASP-3 con síndrome de 3MC causado por una mutación en el exón que codifica la proteasa serina de MASP-3. El síndrome de 3MC es un término unificador para los síndromes de Carneavale, Mingarelli, Malpuech y Michels que se superponen. Estos raros trastornos autosómicos recesivos exhiben un espectro de características de desarrollo, incluyendo dismorfismo facial característico, labio leporino y/o paladar hendido, craneosinostosis, problemas de aprendizaje y anormalidades genitales, de extremidades y vesicorales. Rooryck et al., *Nature Genetics* 43:197-203 (2011) estudiaron 11 familias con síndrome de 3MC e identificaron dos genes mutados, COLEC11 y MASP-1. Las mutaciones en el gen MASP-1 hacen que el exón que codifica el dominio de la proteasa serina de MASP-3, pero no los exones que codifican la proteasa serina de MASP-1, sea disfuncional. Por lo tanto, los pacientes con 3MC con mutaciones en el exón que codifican la proteasa serina de MASP-3 son deficientes de MASP-3, pero suficientes en MASP-1.

Métodos:

El suero deficiente en MASP-3 fue obtenido de un paciente con síndrome 3MC, la madre y el padre del paciente con 3MC (ambos heterocigotos por el alelo que porta una mutación que hace que el exón que codifica el dominio de la proteasa sérica MASP-3 sea disfuncional), así como de un paciente con deficiencia de C4 (deficiente en ambos genes humanos de C4) y un sujeto con deficiencia de MBL. Se llevó a cabo un ensayo de vía alternativa bajo condiciones específicas tradicionales de AP (BBS/ Mg^{++}/EGTA, sin Ca^{++}, donde BBS = solución salina con amortiguador de barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11:291-295 (1981)), en placas de microtitulación recubiertas de zimosán en concentraciones séricas que oscilaban entre el 0.5 y el 25 % y se midió la deposición de C3b a lo largo del tiempo.

Resultados:

La **FIGURA 15** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b por vía alternativa en placas de microtitulación recubiertas de zimosán en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de sujetos con deficiencia de MASP-3, C4 y MBL. Como se muestra en la **FIGURA 15**, el suero del paciente con deficiencia de MASP-3 tiene una actividad residual en la vía alternativa (AP) a altas

concentraciones séricas (25 %, 12.5 %, 6.25 % de concentración sérica), pero un AP_{50} significativamente más alto (es decir, se necesita el 9.8 % del suero para lograr el 50 % de la deposición máxima de C3).

La **FIGURA 16** ilustra gráficamente el nivel de deposición C3b impulsada por la vía alternativa en placas de microtitulación recubiertas de zimosán bajo condiciones "tradicionales" específicas de la vía alternativa (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}) en función del tiempo en muestras de suero humano al 10 % obtenidas de sujetos humanos con deficiencia de MASP-3, deficiencia de C4 y deficiencia de MBL.

La **TABLA 12** resume los resultados de AP_{50} mostrados en la **FIGURA 15** y los tiempos medios para la deposición de C3b mostrados en la **FIGURA 16**.

TABLA 12: **Resumen de los resultados mostrados en las FIGURAS 15 y 16.**

Tipo de suero	**AP_{50} (%)**	**$T_{1/2}$ (min)**
MASP-3-deficiente (paciente con 3MC)	9.8	37.4
Madre del paciente con 3MC (heterocigota)	4.3	17.2
Padre del paciente con 3MC (heterocigoto)	4.3	20.9
deficiente de C4	4.0	11.6
deficiente de MBL	4.8	11.0

Nota: En el tampón BBS/ Mg^{++}/EGTA, los efectos mediados por la vía de la lectina son deficientes debido a la ausencia de Ca^{++} en este tampón.

En resumen, bajo las condiciones de estos ensayos, la vía alternativa está significativamente comprometida en el paciente con 3MC.

3. Medición de la deposición de C3b en manano, zimosán y S. pneumonia D39 en sueros de ratón deficientes de MASP-2 o MASP-1/3.

Métodos:

La deposición de C3b se midió en placas de microtitulación recubiertas de manano, zimosán y S. pneumonia D39 utilizando concentraciones de suero de ratón que oscilaban entre 0 % y 20 % obtenidas de ratones MASP-2-/-, MASP-1/3-/- y WT. Los ensayos de deposición de C3b se llevaron a cabo bajo condiciones específicas de la vía alternativa "tradicionales" (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}), o bajo condiciones fisiológicas que permitieron que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionaran (es decir, BBS/Mg^{++}/Ca^{++}).

Resultados:

La **FIGURA 17A** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas de manano en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de ratones con TW, deficiente de MASP-2 y deficiente de MASP-1/3 bajo condiciones específicas de la vía alternativa tradicional (es decir, BBS/EGTA/Mg^{+++} sin Ca^{++}), o bajo condiciones fisiológicas que permiten que tanto

la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/Mg^{+++}/Ca^{++}). La **FIGURA 17B** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas de zimosán en función de la concentración de suero en muestras de suero de ratones WT, deficientes de MASP-2- y deficientes de MASP-1/3 bajo condiciones específicas de AP tradicionales (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}), o bajo condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa de funcionamiento (BBS/Mg^{+++}/Ca^{++}). La **FIGURA 17C** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b en placas de microtitulación recubiertas de *S. pneumoniae* D39 en función de la concentración de suero en muestras de suero de ratones WT, deficientes de MASP-2 y deficientes de MASP-1/3 bajo condiciones específicas de AP tradicionales (es decir, BBS/EGTA/Mg^{+++} sin Ca^{++}), o bajo condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/Mg^{+++}/Ca^{++}).

La **FIGURA 18A** ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b en sueros altamente diluidos realizado en placas de microtitulación recubiertas de manano en condiciones específicas de AP tradicionales (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}) o en condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/Mg^{+++}/Ca^{++}), utilizando concentraciones séricas que oscilan entre el 0 % y el 1.25 %. La **FIGURA 18B** ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b realizado en placas de microtitulación recubiertas de zimosán en condiciones específicas de AP tradicionales (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}) o en condiciones fisiológicas que permiten tanto la vía de la lectina como la vía alternativa de funcionamiento (BBS/EGTA/Mg^{++}/Ca^{++}), utilizando concentraciones séricas que oscilan entre 0 % y 1.25 %. La **FIGURA 18C** ilustra gráficamente los resultados de un ensayo de deposición de C3b realizado en placas de microtitulación recubiertas de *S. pneumoniae* D39 bajo condiciones específicas de AP tradicionales (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}) o bajo condiciones fisiológicas que permiten que tanto la vía de la lectina como la vía alternativa funcionen (BBS/EGTA/Mg^{+++}/Ca^{+++}), utilizando concentraciones séricas que oscilan entre el 0 % y el 1.25 %.

Como se muestra en las **FIGURAS 18A-C**, los ensayos de deposición de C3b también se llevaron a cabo bajo condiciones específicas de la vía alternativa tradicional (por ejemplo BBS/EGTA/Mg^{+++} sin Ca^{++}) o en condiciones fisiológicas que permitan tanto la vía de la lectina como la vía alternativa para funcionar (BBS/Mg^{+++}/Ca^{++}), utilizando diluciones más altas que oscilan entre el 0 % y el 1.25 % de suero en placas recubiertas de manano (**FIGURA 18A**); placas recubiertas de zimosán (**FIGURA 18B**) y placas recubiertas de *S. pneumoniae* D39 (**FIGURA 18C**). La vía alternativa se reduce con diluciones séricas más altas, por lo que la actividad

observada en el suero deficiente de MASP-1/3 en presencia de Ca^{++} es la actividad LP mediada por MASP-2, y la actividad en el suero deficiente de MASP-2 en presencia de Ca^{++} es la activación residual mediada por MASP-1/3 de la AP.

Discusión:

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

La **FIGURA 1** ilustra la nueva comprensión de la vía de la lectina y de la vía alternativa basada en los resultados proporcionados aquí. La **FIGURA 1** define la función de LEA-2 tanto en la opsonización como en la lisis. Mientras que MASP-2 es el iniciador de la deposición de C3b "descendente" (y opsonización resultante) en múltiples configuraciones dependientes de la lectina fisiológicamente (**FIGURA 18A, 18B, 18C**), también desempeña una función en la lisis de bacterias sensibles al suero. Como se ilustra en la **FIGURA 1**, el mecanismo molecular propuesto responsable del aumento de la actividad bactericida del suero/plasma deficiente de MASP-2 o MASP-2 reducido para patógenos sensibles al suero como *N. meningitidis* es que, para la lisis de las bacterias, los complejos de reconocimiento de la vía de la lectina asociados con MASP-1 y MASP-3 tienen que unirse en estrecha proximidad unos a otros en la superficie de la bacteria, lo que permite que MASP-1 se separe de MASP-3. A diferencia de MASP-1 y MASP-2, MASP-3 no es una enzima autoactivadora, pero, en muchos casos, requiere que la activación/escisión por MASP-1 se convierta en su forma enzimáticamente activa.

Como se muestra en la **FIGURA 1,** el MASP-3 activado puede escindir el factor B unido a C3b en la superficie del patógeno para iniciar la cascada de activación de la vía alternativa mediante la formación de las convertasas C3 y C5 de vía alternativa enzimáticamente activas C3bBb y C3bBb(C3b)n, respectivamente. Los complejos de activación de la vía de la lectina portadores de MASP-2 no tienen nada que ver con la activación de MASP-3 y, en ausencia o después de la reducción de MASP-2, los complejos de activación de la vía de todas las lectinas se cargarán con MASP-1 o MASP-3. Por lo tanto, en ausencia de MASP-2, la probabilidad de que en la superficie microbiana los complejos de activación de la vía lectina MASP-1 y MASP-3 que contienen lectina se sitúen muy cerca uno del otro, llevando a que se activen más MASP-3 y, por lo tanto, a que se produzca una mayor tasa de escición mediada por

MASP-3 del factor B ligado a C3b para formar las convertasas de vía alternativa C3 y C5 de C3bBbb y C3bBb(C3b)n en la superficie microbiana. Esto conduce a la activación de las cascadas de activación de terminales C5b-C9 que forman el complejo de ataque a la membrana, compuesto por C5b asociado con C6, C5bC6 asociado con C7, C5bC6C7 asociado con C8 y C5bC6C7C8, lo que conduce a la polimerización de C9 que se inserta en la estructura de la superficie de la bacteria y forma un poro en la pared bacteriana, lo que conducirá a la destrucción osmolítica de la bacteria atacada por el complemento.

El núcleo de este novedoso concepto es que los datos aquí proporcionados muestran claramente que los complejos de activación de la vía lectina impulsan las dos vías de activación distintas, como se ilustra en la **FIGURA 1**.

EJEMPLO 5

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

Antecedentes/Justificación:

La hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), también conocida como síndrome de Marchiafava-Micheli, es una enfermedad de la sangre adquirida y potencialmente mortal, caracterizada por una anemia hemolítica intravascular inducida por complementos. La característica distintiva de la PNH es la hemólisis intravascular crónica mediada por complemento que es consecuencia de la activación no regulada de la vía alternativa del complemento debido a la ausencia de los reguladores del complemento CD55 y CD59 en los eritrocitos de la PNH, con la subsiguiente hemoglobinuria y anemia. Lindorfer, M.A., et al., *Blood 115*(11) (2010), Risitano, A.M., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11:528-535 (2011). La anemia en la PNH se debe a la destrucción de los glóbulos rojos en el torrente sanguíneo. Los síntomas de la PNH incluyen orina roja, debido a la aparición de hemoglobina en la orina, dolor de espalda, fatiga, falta de aliento y trombosis. La PNH puede desarrollarse por sí sola, denominada " PNH primaria" o en el contexto de otros trastornos de la médula ósea como la anemia aplásica, denominada "PNH secundaria". El tratamiento de la PNH incluye la transfusión de sangre para la anemia, la anticoagulación para la trombosis y el uso del anticuerpo monoclonal eculizumab (Soliris®), que protege a las células sanguíneas contra la destrucción inmunológica al inhibir el sistema del complemento (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med. 350*(6):552-9 (2004)). Eculizumab (Soliris®) es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa sobre el componente del complemento C5, bloqueando su división por convertasas C5, impidiendo así la producción de C5a y el ensamble del MAC. El tratamiento de los pacientes con eculizumab con PNH ha dado lugar a una reducción de la hemólisis intravascular, medida por la lactato deshidrogenasa (LDH), lo que lleva a la estabilización de la hemoglobina y a la independencia de la transfusión en aproximadamente la mitad de los pacientes (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011)). Aunque casi todos los pacientes que reciben tratamiento con eculizumab alcanzan niveles de LDH normales o casi normales (debido al control de la hemólisis intravascular), sólo un tercio de los pacientes alcanza un valor de hemoglobina de aproximadamente 11 g/dL, y los pacientes restantes que reciben eculizumab siguen presentando anemia de moderada a grave (es decir, dependiente de transfusiones), en proporciones casi iguales (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Como se describe en Risitano et al., Mini-Reviews in *Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011), se demostró que los

pacientes con PNH en eculizumab contenían fragmentos de C3 unidos a una parte sustancial de sus eritrocitos de PNH (mientras que los pacientes no tratados no lo contenían), lo que llevó a la conclusión de que los fragmentos de C3 unidos a la membrana funcionan como opsoninas en los eritrocitos de la PNH, lo que da lugar a que queden atrapados en las células reticuloendoteliales a través de los receptores específicos de la C3 y la hemólisis extravascular posterior. Por lo tanto, se necesitan estrategias terapéuticas además del uso de eculizumab para aquellos pacientes que desarrollan hemólisis extravascular mediada por fragmentos de C3 porque siguen necesitando transfusiones de eritrocitos.

Este ejemplo describe métodos para evaluar el efecto del suero deficiente en MASP-2 y MASP-3 sobre la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de un modelo de ratón de PNH y demuestra la eficacia de la inhibición de MASP-2 y/o la inhibición de MASP-3 para tratar a sujetos que sufren de PNH, y también apoya el uso de inhibidores de MASP-2 y/o inhibidores de MASP-3 (incluyendo inhibidores de MASP-2/MASP-3 duales o biespecíficos) para mejorar los efectos de la hemólisis extravascular mediada por fragmentos de C3 en sujetos con PNH que reciben tratamiento con un inhibidor de C5 como el eculizumab.

Métodos:

Modelo animal de PNH:

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones con deficiencias genéticas de Crry y C3 (Crry/C3-/-) y CD55/CD59-ratones con deficiencias genéticas. A estos ratones les faltan los respectivos reguladores de complemento de superficie en sus eritrocitos y estos eritrocitos son, por lo tanto, susceptibles a la autolisis espontánea del complemento, al igual que las células sanguíneas humanas PNH.

Con el fin de sensibilizar aún más a estos eritrocitos estas células fueron utilizadas con y sin recubrimiento por manano y luego probadas para hemólisis en plasma WT C56/BL6, plasma nulo MBL, plasma MASP-2 -/-, plasma MASP-1/3 -/-, plasma humano, NHS humano, plasma MBL -/- humano y NHS tratado con anticuerpos MASP-2 humanos.

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

Día 1. Preparación de RBC de murino (± revestimiento de manano).

Materiales incluidos: sangre fresca de ratón, BBS/Mg^{++}/Ca^{++} (4.4 mM de ácido barbitúrico, 1.8 mM de barbitona sódica, 145 mM de NaCl, pH 7.4, 5mM de Mg^{++}, 5mM de Ca^{++}), cloruro de cromo, $CrCl_3$-$6H_20$ (0.5mg de mg/mL en BBS/Mg^{++}/Ca^{++}) y manano, 100 µg/mL en BBS/Mg^{++}/Ca^{++}.

La sangre total (2 mL) fue centrifugada durante 1-2 minutos a 2000xg en una centrifugadora refrigerada en 4°C. El plasma y la capa leucocitaria fueron aspirados. A continuación, la muestra se lavó 3 veces volviendo a suspender elgránulo de RBC en 2 mL de BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} y repitiendo el paso de centrifugación. Después del tercer lavado, elgránulo se volvió a suspender en 4 mL BBS/Mg^{++}/Ca^{++}. Se apartó una alícuota de 2 ml del RBC como control no recubierto. A los 2 mL restantes, se añadieron 2 mL de CrCl3 y 2 mL de manán y la muestra se incubó con una mezcla suave a RT durante 5 minutos. La reacción finalizó con la adición de 7.5 mL de BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++}. La muestra se centrifugó como se indica arriba, se volvió a suspender en 2 mL de BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} helados y se lavó dos veces más como se indica arriba, y luego se almacenó a 4°C

Día 2. Ensayo de hemólisis

Los materiales incluyeron BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} (como se mencionó previamente), sueros de prueba, placas de fondo redondo y plano de 96 pocillos y un espectrofotómetro que lee placas de 96 pocillos a 410-414 nm.

Primero se determinó la concentración de los RBC y las células se ajustaron a 10^9/mL, y se almacenaron a esta concentración. Antes de su uso, las células se diluyeron en tampón de ensayo a 10^8/mL, y luego se utilizaron 100 µL por pocillo. La hemólisis se midió a 410-414 nm (permitiendo una mayor sensibilidad que 541nm). Las diluciones de los sueros de prueba se prepararon en BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} helados. 100µL de cada dilución de suero se pipeteó en una placa de fondo redondo. Se agregaron 100 µL de preparación de RBC debidamente diluidos (es decir, 10^8/mL), se incubaron a 37°C durante aproximadamente 1 hora y se observaron para la lisis. (Las placas pueden ser fotografiadas en este punto.) La placa fue entonces centrifugada a la velocidad máxima durante 5 minutos. Se aspiraron 100 µL de la fase líquida, se transfirieron a placas de fondo plano y se registró el diámetro exterior a 410-414 nm. Losgránulos de RBC fueron retenidos (estos pueden ser posteriormente lisados con agua para obtener un resultado inverso).

Experimento #1

Se obtuvo sangre fresca de ratones con doble deficiencia de CD55/CD59 y se prepararon sangre de ratones y eritrocitos con doble deficiencia de Crry/C3, tal como se describe en detalle en el protocolo anterior. Las células fueron divididas y la mitad de las células fueron recubiertas con manano y la otra mitad se dejó sin tratar, ajustando la concentración final a 10^8/mL, de los cuales 100 µL se utilizaron en el ensayo de hemólisis, el cual se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Resultados del Experimento #1: La vía de la lectina está involucrada en la lisis de eritrocitos en el modelo animal PNH

En un experimento inicial, se determinó que los eritrocitos de ratón WT no recubiertos no se lisaban en ningún suero de ratón. Se determinó además que los eritrocitos de Crry-/- ratón recubiertos de manano fueron lisados lentamente (más de 3 horas a 37 grados) en el suero de ratón WT, pero no en el suero nulo de MBL. (Datos no mostrados).

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

Conclusiones del Experimento #1

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

Experimento #2

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

Resultados del Experimento #2: Los inhibidores MASP-2 y la deficiencia de MASP-3 previenen la lisis eritrocítica en el modelo animal de PNH

Con los eritrocitos Crry-/- ratón recubiertos de manano, NHS fue incubado en las diluciones diluidas a 1/640 (es decir, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640), suero humano MBL-/, suero humano deficiente en MASP-3 (a partir de un paciente con 3MC), y NHS pretratado con MASP-2 mAb, y NHS inactivado por calor como control.

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

Se observó que el suero MASP-3 -/- no lisaba eritrocitos de ratón recubiertos con manano. En el control NHS inactivado por calor (control negativo), como se esperaba, no se observó lisis. Los eritrocitos de ratón de MBL -/- de suero humano lisado recubiertos con manano a diluciones 1/8 y 1/16. El NHS pretratado con anticuerpos contra MASP-2 lisó eritrocitos de ratón recubiertos con manano a diluciones 1/8 y 1/16, mientras que suero humano WT lisó eritrocitos de ratón recubiertos con manano hasta diluciones de 1/32.

La **FIGURA 19** ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3-/-) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por suero humano en un rango de diluciones de suero en suero de MASP 3 -/-, NHS inactivado por calor (HI), MBL -/-, NHS pretratado con anticuerpo MASP-2 y control de NHS.

La **FIGURA 20** ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (Crry/C3-/-) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos recubiertos con manano por suero humano en un rango de concentración de suero en suero de MASP-3 -/-, NHS inactivado por calor (HI), MBL -/-, NHS pretratado con anticuerpo MASP-2 y control de NHS.

A partir de los resultados mostrados en las **FIGURAS 19** y **20**, se demuestra que la inhibición de MASP-3 prevendrá cualquier lisis mediada por el complemento de eritrocitos sensibilizados con protección deficiente de la activación autóloga del complemento. La inhibición de MASP-2 con el anticuerpo MASP-2 cambió significativamente el CH_{50} y fue protectora en cierta medida, pero la inhibición de MASP-3 fue más efectiva.

Experimento # 3

Los eritrocitos de ratón Crry -/- no recubiertos obtenidos de sangre fresca de ratones con doble deficiencia de Crry/C3 y CD55/CD59 se analizaron en el ensayo de hemólisis como se describió anteriormente en presencia de los siguientes sueros:

MASP-3 -/-; MBL - /-; WT; NHS pretratado con anticuerpo MASP-2 humano y NHS inactivado por calor como control.

Resultados:

La **FIGURA 21** ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón WT lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos en un intervalo de concentraciones séricas en sueros humanos de un paciente 3MC (MASP-3 - / -) , NHS inactivado por calor (HI), MBL - / -, NHS pretratado con anticuerpo MASP-2 y control de NHS. Como se muestra en la **FIGURA 21** y se resume en la **TABLA 13**, se demuestra que la inhibición de la MASP-3 inhibe la lisis mediada por el complemento de eritrocitos de ratón WT no sensibilizados.

La **FIGURA 22** ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de ratón lisados (CD55/59 -/-) en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos murinos no recubiertos por suero humano en un rango de concentraciones de suero en sueros humanos de NHS inactivados por el calor (HI), MBL -/-, NHS pretratado con anticuerpo MASP-2 y control de NHS. Como se muestra en la **FIGURA 22** y se resume en la **TABLA 13**, se demuestra que la inhibición de MASP-2 era protectora hasta cierto punto.

TABLA 13: Valores de CH_{50} expresados en concentraciones séricas.

Suero	**WT**	**CD55/59 -/-**
Paciente con 3MC	No lisis	No lisis
NHS inactivado por calor	No lisis	No lisis
MBL AO / XX donante (MBL deficiente)	7.2%	2.1 %
NHS + MASP-2 anticuerpos	5.4 %	1.5 %
NHS	3.1 %	0.73 %

Nota: "CH_{50}" es el punto en el que la hemólisis mediada por el complemento alcanza el 50%.

En resumen, los resultados en este Ejemplo demuestran que la inhibición de MASP-3 previene cualquier lisis del complemento de eritrocitos sensibilizados y no sensibilizados con protección deficiente de la activación autóloga del complemento. La inhibición de MASP-2 también es protectora en cierta medida. Por lo tanto, los inhibidores de MASP-2 y MASP-3 solos o en combinación (es decir, administrados en conjunto, administrados secuencialmente) o los inhibidores biespecíficos o duales de MASP-2/MASP-3 pueden usarse para tratar a sujetos que padecen PNH, y también pueden utilizarse para mejorar (es decir, inhibir, prevenir o reducir la gravedad de)

la hemólisis extravascular en pacientes con PNH que reciben tratamiento con un inhibidor de C5 como eculizumab (Soliris®).

EJEMPLO 6

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

Métodos:

1. Ensayo de hemólisis de RBC de conejo (recubierto de manano) en sueros deficientes de MASP-1/3 de ratón y sueros de control WT

Día 1. Preparación de RBC de conejo.

Materiales incluidos: sangre fresca de conejo, BBS/Mg^{++} / Ca^{++} (ácido barbitúrico de 4.4 mM, barbitone sódico de 1.8 mM, NaCl de 145 mM, pH 7.4, Mg^{++} de 5 mM, Ca^{++} de 5 mM), BBS/Mg^{++}/Ca^{++} con gelatina al 0.1%, cromo cloruro contenido en tampón; es decir, $CrCl_3$.6 H_2O (0.5 mg/mL en BBS/Mg^{++}/Ca^{++}) y manano, 100 µg/mL en BBS/Mg^{++}/Ca^{++}.

1. La sangre completa de conejo (2 ml) se dividió en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 8000 rpm (aproximadamente 5.9 rcf) en una centrífuga eppendorf refrigerada a 4 °C. Elgránulo de RBC se lavó tres veces después de volver a suspenderlo en BBS/Mg^{++}/Ca^{++} helado. Después del tercer lavado, elgránulo se resuspendió en 4 ml de BBS/Mg^{++} /Ca^{++}. Se agregaron dos ml de esta alícuota a un tubo de halcón de 15 ml para usar como control sin recubrimiento. Los 2 ml restantes de la alícuota de RBC se diluyeron en 2 ml de tampón $CrCl_3$, se agregaron 2 ml de la solución de manano y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos con una mezcla suave. La reacción se terminó mediante la adición de 7.5 mL de BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} a la mezcla. Los eritrocitos se granularon y los RBC se lavaron dos veces con BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} como se describió anteriormente. La suspensión de RBC se almacenó en BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} a 4 ºC.

2. 100 µl de RBC suspendidos se diluyeron con 1.4 ml de agua y se centrifugaron a 8000 rpm (aproximadamente 5.9 rcf) durante 3 minutos y la OD del sobrenadante se ajustó a 0.7 a 541nm (una OD de 0.7 a 541nm corresponde a aproximadamente 10^9 eritrocitos/mL).

3. Los RBC resuspendidos se diluyeron con BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} a una concentración de 10^8/mL.

4. Las diluciones de los sueros de prueba se prepararon en BBS/gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} helada y se pipetearon 100 µL de cada dilución de suero en el pocillo correspondiente de la placa de fondo redondo. Se agregaron 100 µL de RBC diluidos apropiadamente (108/mL) a cada pocillo. Como control de la lisis completa,

se mezcló agua purificada (100 µL) con el RBC diluido (100 µL) para causar 100 % de lisis, mientras que BBS/0.1 % gelatina/ Mg^{++}/Ca^{++} sin suero (100 µL) se utilizó como control negativo. La placa se incubó durante 1 hora en 37°C

5. La placa de fondo redondo se centrifugó a 3250 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de cada pocillo (100 µL) se transfirió a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano y se leyó OD en un lector ELISA a 415-490 nm. Los resultados se informan como la relación de la OD a 415 nm con respecto a 49 0 nm.

Resultados:

La **FIGURA 23** ilustra gráficamente la hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano por suero de ratón en un rango de concentraciones séricas en suero de MASP-1/3-/- y control WT. Como se muestra en la **FIGURA 23**, se demuestra que la inhibición de MASP-3 previene la lisis mediada por el complemento de los eritrocitos de conejo WT recubiertos con manano. Estos resultados apoyan aún más el uso de inhibidores de MASP-3 para el tratamiento de uno o más aspectos de la PNH como se describe en el Ejemplo 5.

EJEMPLO 7

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

Antecedentes /Justificación:

Los anticuerpos contra MASP-1 y MASP-3 humanas se generaron usando un sistema *in vitro* que comprende una línea celular DT40 modificada, DTLacO, que permite la inducción reversible de la diversificación de un polipéptido particular, como se describe más detalladamente en los documentos WO2009029315 y US2010093033. DT40 es una línea de células B de pollo que se sabe que muta de forma constitutiva sus genes de inmunoglobulina (Ig) de cadena pesada y ligera en cultivo. Al igual que otras células B, esta mutagénesis constitutiva se dirige a las mutaciones en la región V de los genes Ig y, por lo tanto, en las CDR de las moléculas de anticuerpos expresadas. La mutagénesis constitutiva en células DT40 tiene lugar por conversión genética utilizando como secuencias donantes una serie de segmentos de genes V no funcionales (genes pseudo-V; ψV) situados en la parte ascendente de cada región V funcional. Se demostró previamente que la eliminación de la región ψV causa un cambio en el mecanismo de diversificación de la conversión genética a hipermutación somática, el mecanismo comúnmente observado en las células B humanas. La línea de linfoma de células B de pollo DT40 ha demostrado ser un punto

de partida prometedor para la evolución de anticuerpos *ex vivo* (Cumbers, SJ *et al. Nat Biotechnol* 20, 1129-1134 (2002); Seo, H. *et al. Nat Biotechnol* 23, 731-735 (2005)). Las células DT40 proliferan de manera robusta en el cultivo, con un tiempo de duplicación de 8 a 10 horas (en comparación con 20-24 horas para las líneas de células B humanas), y admiten la orientación de genes homólogos muy eficientes (Buerstedde, JM *et al. Embo J* 9, 921-927 (1990)). Las células DT40 comandan una enorme diversidad potencial de secuencia de la región V dado que pueden acceder a dos vías fisiológicas distintas para la diversificación, la conversión genética y la hipermutación somática, que crean mutaciones con plantilla y sin plantilla, respectivamente (Maizels, *N. Annu Rev Genet* 39, 23-46 (2005)). Las inmunoglobulinas (Igs) de cadenas pesadas y ligeras diversificadas se expresan en forma de una IgM visualizada en la superficie celular. La IgM de superficie tiene una forma bivalente, estructuralmente similar a una molécula de IgG. Las células que muestran IgM con especificidad para un antígeno particular pueden aislarse uniendo versiones solubles inmovilizadas o exhibidas en membrana del antígeno. Sin embargo, la utilidad de las células DT40 para la evolución de anticuerpos ha sido limitada en la práctica porque, como en otras líneas de células B transformadas, la diversificación se produce a menos del 1 % de la velocidad fisiológica.

En el sistema utilizado en este ejemplo, como se describe en los documentos WO2009029315 y US2010093033, las células DT40 se diseñaron para acelerar la tasa de diversificación del gen de Ig sin sacrificar la capacidad de modificación genética adicional o el potencial de conversión genética e hipermutación somática para contribuir a la mutagénesis. Se realizaron dos modificaciones clave a DT40 para aumentar la tasa de diversificación y, en consecuencia, la complejidad de las especificidades de unión en nuestra biblioteca de células. Primero, la diversificación del gen Ig se puso bajo el control de la potente red reguladora del operador/represor de la lactosa de *E. coli*. Se insertaron multímeros que consistían en aproximadamente 100 repeticiones polimerizadas del potente operador de lactosa de E. coli (PolyLacO) ascendente de los genes de Igλ e IgH reordenados y expresados por orientación de genes homólogos. Los factores reguladores fusionados a la proteína represora de la lactosa (LacI) pueden vincularse a los elementos reguladores de LacO para regular la diversificación, aprovechando la alta afinidad (kD = 10^{-14} M) del represor de lactosa para el ADN operador. Las células DT40 PolyLacO-λ_R, en las que PolyLacO se integró solo en Igλ, mostraron un aumento de 5 veces en la tasa de diversificación del gen de Ig respecto a las células DT40 parentales antes de cualquier ingeniería (Cummings, WJ *et al. PLoS Biol* 5, e246 (2007)). La diversificación se elevó aún más en las células diseñadas para transportar PolyLacO dirigidas tanto a los genes Igλ como a los genes IgH ("DTLacO"). Se demostró que las células DTLacO tienen tasas

de diversificación elevadas de 2.5 a 9.2 veces en relación con la característica del 2.8 % de la línea parental DT40 PolyLacO-λ_R LacI-HP1. Por lo tanto, la orientación de los elementos PolyLacO a los genes de las cadenas pesada y ligera aceleró la diversificación 21.7 veces en relación con la línea celular parental DT40. La vinculación de los factores reguladores a los loci de Ig no solo altera la frecuencia de mutagénesis, sino que también puede cambiar la vía de la mutagénesis, creando una recolección más grande de cambios de secuencia únicos (Cummings et al. 2007; Cummings et al. 2008). En segundo lugar, se generó una colección diversa de puntos de inicio de secuencia para la diversificación del gen de Ig acelerado por factor atado. Estos diversos puntos de inicio de secuencia se agregaron a DTLacO dirigiéndose a las regiones variables de la cadena pesada de Ig reorganizadas, aisladas de un polluelo de dos meses de edad, al locus de la cadena pesada. La adición de estas regiones variables de cadena pesada creó un repertorio de 107 nuevos puntos de partida para la diversificación de anticuerpos. La construcción de estos nuevos puntos de partida en la línea celular DTLacO permite la identificación de clones que se unen a un objetivo particular, y luego la rápida maduración de la afinidad por los factores asociados. Después de la maduración de afinidad, se produce una IgG quimérica recombinante de longitud completa mediante la clonación de las secuencias variables de la cadena pesada y ligera maduradas y reorganizadas (VH y Vλ; que consisten en regiones marco de pollo y las regiones determinantes de complementariedad o CDR) en vectores de expresión que contienen IgG1 humana y regiones constantes lambda. Estos mAb recombinantes son adecuados para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, y sirven como punto de partida para la humanización.

Métodos:

Selección para la unión del antígeno MASP-1 y MASP-3.

Las selecciones iniciales se realizaron uniendo las poblaciones de DTLacO diversificadas por la orientación de genes a microesferas complejadas con MASP-1 humana (SEQ ID NO: 8) y antígeno MASP-3 (SEQ ID NO: 2); y selecciones subsiguientes por FACS, usando antígeno soluble marcado con fluorescencia (Cumbers, SJ *et al. Nat Biotechnol* **20**, 1129-1134 (2002); Seo, H. *et al. Nat Biotechnol* **23**, 731-735 (2005). Debido a la secuencia de aminoácidos conservada en la cadena alfa que se comparte entre MASP-1 y MASP-3 (que se muestra en la **FIGURA 2**), y las distintas secuencias de la cadena beta (que se muestran en la **FIGURA 2**), pantallas paralelas separadas para los aglutinantes de la MASP-1 y MASP-3 se llevaron a cabo para identificar mAbs específicos de MASP-1, mAbs específicos de MASP-3 y también mAbs capaces de unirse tanto a MASP-1 como a MASP-3 (dual-específico). Se usaron dos formas de antígeno para seleccionar. En primer lugar, MASP-1 o MASP-3 recombinante, ya sea de longitud completa o un

fragmento, fusionado a un dominio Fc se unieron a las microesferas de la proteína G magnética Dynal o se usaron en selecciones basadas en FACS usando un anticuerpo IgG (Fc) secundario antihumano y -etiquetado con PECy5. Alternativamente, las versiones recombinantes de las proteínas MASP-1 o MASP-3 se marcaron directamente con harinas Dylight y se usaron para las selecciones y exploraciones.

Unión y afinidad.

Se generaron anticuerpos recombinantes clonando regiones V amplificadas por PCR en un vector que apoyaba la expresión de IgG1 humana en células 293F (Yabuki et al., *PLoS ONE*, 7 (4): e36032 (2012)). La cinética de unión a la saturación se determinó tiñendo las células DTLacO que expresan la unión al anticuerpo MASP-1 o MASP-3 con diversas concentraciones de antígeno soluble etiquetado con fluorescencia. Los ensayos funcionales para la actividad específica de MASP-3, incluyendo la deposición de C3b dependiente de MASP-3 y la escisión del factor D dependiente de MASP-3, se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos 8 y 9, respectivamente. Un ensayo funcional para la actividad específica de MASP-1, a saber, la inhibición de la deposición de C3b dependiente de MASP-1 se llevó a cabo como se describe a continuación.

Resultados:

Se generaron numerosos anticuerpos de unión a MASP-1 y MASP-3 usando los métodos descritos anteriormente. La unión, como se demostró por el análisis FACS, se describe para los clones representativos M3J5 y M3M1, que se aislaron en pantallas para los aglutinantes MASP-3.

La **FIGURA 24A** es un histograma de FACS de la unión del antígeno/anticuerpo MASP-3 para el clon M3J5 de DTLacO. La **FIGURA 24B** es un histograma de FACS de la unión del antígeno/anticuerpo MASP-3 para el clon M3M1 de DTLacO. En las **FIGURAS 24A** y **24B,** las curvas rellenas de color gris son control negativo teñido con IgG1, y las curvas negras gruesas son tinción con MASP-3.

La **FIGURA 25** ilustra gráficamente una curva de unión de saturación del clon M3J5 (Clon 5) para el antígeno MASP-3. Como se muestra en la **FIGURA 25,** la afinidad de unión aparente del anticuerpo M3J5 para MASP-3 es de aproximadamente 31 nM.

El análisis de la secuencia de los clones identificados se realizó utilizando métodos estándares. Todos los clones se compararon con las secuencias VH y VL comunes (DT40) y entre sí. Las secuencias para los dos clones mencionados anteriormente, M3J5 y M3M1 se proporcionan en una alineación con dos clones representativos adicionales, D14 y 1E10, que se identificaron en las pantallas para los fragmentos CCP1-CCP2-SP de MASP-1 y MASP-3, respectivamente. Las regiones de unión D14 y 1E10 son comunes tanto para MASP-1 como para MASP-3.

La **FIGURA 26A** es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VH de DT40 de pollo.

La **FIGURA 26B** es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VL de M3J5, M3M1, D14 y 1E10 a la secuencia VL DT40 de pollo.

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

Secuencias de región variable de cadena pesada (VH)

La **FIGURA 26A** muestra una alineación de aminoácidos de las secuencias de la Región Variable de la Cadena Pesada (VH) para el DTLacO padre (SEQ ID NO: 300), los clones de unión a MASP-3 M3J5 (SEQ ID NO: 301) y M3M1 (SEQ ID NO: 302), y los clones de unión dual MASP-1 / MASP-3 D14 (SEQ ID NO: 306) y 1E10 (SEQ ID NO: 308).

Las CDR de Kabat en las siguientes secuencias VH están ubicadas en las siguientes posiciones de aminoácidos: H1: aa 31-35; H2: aa 50-62; y H3: aa 95-102.

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

DTLacO VH parental: (SEQ ID NO: 300))
AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDDDGSGTRY
APAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYYCTKCAYSSGCDYEGGYIDAWGHGTEVI
VSS

Clon M3J5 VH: (SEQ ID NO: 301)
AVTLDESGGGLQTPGG**G**LSLVCKASGFTFSSYAMGWMRQAPGKGLEYVAGIRSDGSFTLYAT
AVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYFCTRSGNVGDIDAWGHGTEVIVSS

Clon M3M1 VH: (SEQ ID NO: 302)
AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDFSSYQMNWIRQAPGKGLEFVAAINRFGNSTGHG
AAVKGRVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTATYYCAKGVYGYCGSYSCCGVDTIDAWGHGT
EVIVSS

Clon D14 VH: (SEQ ID NO: 306)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAGIYKSGAGTNYA
PAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKTTGSGCSSGYRAEYIDAWGHGTEVI
VSS

Clon 1E10 VH: (SEQ ID NO:308)
AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMVWVRQAPGKGLEFVAGISRNDGRYTEYG
SAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARDAGGSAYWFDAGQIDAWGHGTEVI
VSS

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

La FIGURA 26B muestra una alineación de aminoácidos de las secuencias de la Región Variable de la Cadena Ligera (VL) para el DTLacO padre (SEQ ID NO: 303) y los clones de unión a MASP-3 M3J5 (SEQ ID NO: 304) y M3M1 (SEQ ID NO: 305), y los clones de unión dual MASP-1/MASP-3 D14 (SEQ ID NO: 307) y 1E10 (SEQ ID NO: 309).

DTLacO VL parental: (SEQ ID NO: 303)
ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIPSRF
SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

Clon M3J5 VL: (SEQ ID NO:304)
ALTQPASVSANPGETVKITCSGGYSGYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRF
SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

Clon M3M1 VL: (SEQ ID NO:305)
ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRFS
GSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

Clon D14 VL: (SEQ ID NO:307)
ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRFS
GSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

Clon 1E10 VL: (SEQ ID NO:309)
ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRFS
GSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

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

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

La **FIGURA 27** es un gráfico de barras que muestra la actividad inhibidora del mAb 1E10 en comparación con el suero positivo provisto con el kit de ensayo, así como un anticuerpo de control de isotipo. Como se muestra en la **FIGURA 27**, el mAb 1E10 demuestra una inhibición parcial de la activación dependiente de LEA-2 (a través de la inhibición de la activación de MASP-2 dependiente de MASP-2), mientras que el anticuerpo de control de isotipo no lo hace. Se debe lograr una inhibición más fuerte mediante la maduración de afinidad continua de este anticuerpo para la unión de MASP-1 utilizando los factores anclados en el sistema DTLacO.

Los ensayos de función LEA-1 (dependientes de MASP-3) para mAbs representativos se describen a continuación en los Ejemplos 8 y 9.

Resumen de Resultados:

Los resultados anteriores mostraron que la plataforma DTLacO permitió el descubrimiento ex vivo rápido de los anticuerpos monoclonales MASP-1 y MASP-3 con propiedades inhibidoras en LEA-1 (como se muestra a continuación en los Ejemplos 8 y 9) y en LEA-2 (como se muestra en este Ejemplo).

EJEMPLO 8

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

Antecedente/Justificación:

Se determinó que MASP-3 no se activa a través de la exposición a manano en fase líquida no inmovilizada, zimosán A o N-acetil cisteína, ya sea en presencia o en ausencia de suero humano normal. Sin embargo, se determinó que las MASP-3 recombinantes y nativas se activan en la superficie de *S. aureus* inactivado por calor en presencia y ausencia de suero humano normal (NHS) o suero humano inactivado por calor (HIS) (datos no mostrados). También se determinó que la deposición de C3b se produce en la superficie de *S. aureus* en presencia de suero humano normal, y que la deposición puede controlarse utilizando un citómetro de flujo. Por lo tanto, la respuesta de la vía alternativa (AP) a *S. aureus* se midió como se describe en este Ejemplo como un medio para evaluar la contribución de MASP-3 a LEA-1.

Métodos:

MASP-3 recombinante: secuencias de polinucleótidos que codifican la MASP-3 humana recombinante de longitud completa, una serina proteasa truncada (SP) versión activa de MASP-3 (CCP1-CCP2-SP), y una forma inactivada por SP de MASP-3 (S679A) se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pTriEx7 (Invivogen). Las construcciones de expresión resultantes codifican el fragmento de longitud completa MASP-3 o CCP1-CCP2-SP con un Streptag amino-terminal y una etiqueta His6 carboxi-terminal. Las construcciones de expresión se transfectaron en células Freestyle 293-F o Expi293F (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos proporcionados por el fabricante. Después de tres a cuatro días de cultivo en CO_2 al 5 % a 37ºC, las proteínas recombinantes se purificaron utilizando cromatografía de afinidad con estreptactina.

MASP-1 recombinante: las formas CCP1-CCP2-SP de longitud completa o truncadas de MASP-1 recombinante con o sin el R504Q estabilizador (Dobo et al., *J. Immunol* 183: 1207, 2009) o mutaciones inactivadoras de SP (S646A) y que llevan un Steptag amino-terminal y una etiqueta His6 carboxi-terminal se generaron como se describe para MASP-3 recombinante anterior.

1. ***Deposición de C3b y división del factor B en S. aureus en suero con 3MC (humano)***

Se realizó un experimento inicial para demostrar que el ensayo de citometría de flujo es capaz de detectar la presencia o ausencia de deposición de C3b impulsada por AP (AP-C3b) de la siguiente manera. Cinco por ciento de los siguientes sueros: suero humano normal, suero humano agotado de factor B (factor B), suero humano agotado de factor D, y suero humano agotado de properdina (obtenidos de Complement Technology, Tyler, Texas, EE. UU.) se mezclaron con la prueba Anticuerpo en tampón Mg^{++}/EGTA o EDTA a 4ºC durante la noche. Se añadió *S. aureus* (108/reacción) muerto por calor a cada mezcla hasta un volumen total de 100 µL y se rotó a 37ºC durante 40 minutos. Las bacterias se lavaron en tampón de lavado, elgránulo bacteriano se resuspendió en tampón de lavado y se analizó una parte alícuota de 80 µl de cada muestra para determinar la deposición de C3b en la superficie bacteriana, que se detectó con C3c antihumano (Dako, Reino Unido) utilizando el flujo citometría.

Los resultados de la detección por citometría de flujo de C3b se muestran en la **FIGURA 28A**. Como se muestra en la **FIGURA 28A**, panel 1, suero humano normal en presencia de EDTA, que se sabe que inactiva el AP, no se observó deposición de C3b (control negativo). En el suero humano normal tratado con Mg^{++}/EGTA, solo pueden funcionar las vías del complemento independientes de la lectina. En el panel 2, se usa el tampón Mg^{++}/EGTA, por lo tanto, el AP está activo y se observa una deposición de C3b impulsada por el AP (control positivo). Como se

muestra en el panel 3, 4 y 5, en suero agotado de factor B, agotado de factor D y agotado de properdina, respectivamente, no se observa deposición de C3b impulsada por una vía alternativa, como se esperaba. Estos resultados demuestran que el ensayo es capaz de detectar la deposición de C3b dependiente de AP.

Se realizó unaa deposición de C3b en el ensayo de *S. aureus* como se describió anteriormente para evaluar la capacidad de MASP-3 recombinante para reconstituir el AP (LEA-1) en suero humano con 3MC, que es deficiente en MASP-3 (Rooryck C, et al., *Nat Genet.* 43 (3): 197-203 (2011)). Las siguientes combinaciones de reactivos fueron probadas.

1. 5 % de suero humano normal + EDTA
2. 5 % de suero humano normal + Mg/EGTA
3. 5 % de suero humano con 3MC (MASP-$3^{-/-}$) + Mg^{++}/EGTA
4. 5 % de 3MC humano (MASP-$3^{-/-}$) suero + Mg^{++}/EGTA más rMASP-3 activo de longitud completa
5. 5 % de 3MC humano (MASP-$3^{-/-}$) suero + Mg^{++}/EGTA más rMASP-3 activo truncado (CCP1 / CCP2 / SP)
6. 5 % de 3MC humano (MASP-$3^{-/-}$) suero + Mg^{++}/EGTA más rMASP-3 inactivo (S679A)
7. 5 % de 3MC humano (MASP-$3^{-/-}$) suero + Mg^{++}/EGTA más rMASP-1 de longitud completa activa.

Las diversas mezclas de suero al 5 % y proteínas recombinantes (5 µg de cada una) como se muestra arriba se incubaron en condiciones de tampón especificadas (ya sea tampón Mg^{++}/EGTA o EDTA) a 4ºC durante la noche. Después de la incubación durante la noche, se agregaron 10^8 *S. aureus* muertos por calor a cada mezcla en un volumen total de 100 µl y se rotaron a 37ºC durante 40 minutos. Las bacterias se lavaron y se resuspendieron en tampón de lavado y se analizó una parte alícuota de 80 µl de cada muestra para determinar la deposición de C3b por FACS. Las alícuotas de 20 µL restantes de cada muestra se usaron para medir la escisión del factor B mediante Western blot usando un anticuerpo anti-factor B como se describe a continuación.

Los resultados de la detección por citometría de flujo de C3b se muestran en la **FIGURA 28B**. Los números de panel corresponden a los números designados para cada una de las combinaciones de reactivos descritas anteriormente. El control negativo (panel 1) y el control positivo (panel 2) muestran la ausencia y presencia de deposición de C3b, como se esperaba. El panel 3 muestra que la deposición de C3b impulsada por AP está ausente en el suero con 3MC. Los paneles 4 y 5 muestran que el rMASP-3 activo completo (panel 4) y el rMASP-3 activo (CCP1-CCP2-SP) (panel 5) restauran la deposición de C3b impulsada por AP en suero con 3MC. El panel 6

muestra que el rMASP-3 inactivo (S679A) no restaura la deposición de C3b impulsada por AP en el suero con 3MC. El panel 7 muestra que rMASP-1 no restaura la deposición de C3b impulsada por AP en suero con 3MC.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que se requiere MASP-3 para la deposición de C3b impulsada por AP en S. aureus en suero humano.

Activación del factor B dependiente de MASP-3

Con el fin de analizar la activación dependiente de MASP-3 del Factor B, las diversas mezclas de suero al 5 % (suero humano normal o suero de paciente con 3MC) y proteínas recombinantes como se muestra arriba se analizaron como se describió anteriormente. De cada mezcla de reacción, se retiraron 20 µL y se agregaron al tampón de carga de muestra de proteína. Las muestras se calentaron a 70ºC durante 10 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE. El análisis de Western blot se realizó utilizando un anticuerpo policlonal de Factor B (R&D Systems). La activación del Factor B fue evidente por la formación de dos productos de escisión de peso molecular inferior (Bb y Ba) derivados de la proteína pro-Factor B de mayor peso molecular.

La **FIGURA 29** muestra los resultados de un análisis de Western blot para determinar la escisión del factor B en respuesta a *S. aureus* en suero con 3MC en presencia o ausencia de rMASP-3. Como se muestra en el carril 1, el suero humano normal en presencia de EDTA (control negativo) muestra una escisión muy pequeña del Factor B en relación con el suero humano normal en presencia de Mg^{++}/EGTA, que se muestra en el carril 2 (control positivo). Como se muestra en el carril 3, el suero 3MC muestra muy poca escisión del Factor B en presencia de Mg^{++}/EGTA. Sin embargo, como se muestra en el carril 4, la división del Factor B se restaura mediante la adición y preincubación de la proteína MASP-3 recombinante de longitud completa (5 µg) en el suero con 3MC.

Ensayo para determinar el efecto de rMASP-3 en pro-factor D en la escisión del factor B/C3 (H2O)

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

C3 (H_2O) (200ng), factor de plasma purificado B (20 µg), pro-factor D recombinante (200 ng) y MASP-3 humana recombinante (200 ng) se mezclaron en varias combinaciones (como se muestra en la **FIGURA 30**), en un volumen total de 100 µL en BBS/Ca^{++}/Mg^{++} e incubado a 30ºC durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 uL de colorante de carga de SDS que contenía 2-mercaptoetanol al 5 %. Después de hervir a 95ºC durante 10 minutos bajo agitación (300 rpm), la mezcla se centrifugó a 1400 rpm durante 5 minutos y se cargaron 20

ul del sobrenadante y se separaron en un gel de SDS al 10 %. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

Resultados:

La **FIGURA 30** muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Comassie en el que se analiza la escisión del factor B. Como se muestra en el carril 1, la división del factor B es más óptima en presencia de C3, MASP-3 y pro-factor D. Como se muestra en el carril 2, C3 es absolutamente necesario; sin embargo, como se muestra en los carriles 4 y 5, tanto MASP-3 como el pro-factor D son capaces de mediar la escisión del factor B, siempre y cuando esté presente C3.

Análisis de la capacidad de los mAbs MASP-3 para inhibir la deposición de C3b impulsada por AP dependiente de MASP-3

Como se describe en este Ejemplo, se demostró que se requiere MASP-3 para la deposición de C3b impulsada por AP en *S. aureus* en suero humano. Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente ensayo para determinar si un mAb de MASP-3 representativo identificado como se describe en el Ejemplo 7, podría inhibir la actividad de MASP-3. La proteína MASP-3 (CCP1-CCP2-SP) activa y recombinante (250 ng) se preincubó con un mAb de control de isotipo, mAb1A5 (control obtenido de la plataforma DTLacO que no se une a MASP-3 o MASP-1), o mAbD14 (se une a MASP-3) en tres concentraciones diferentes (0.5, 2 y 4 μM) durante 1 hora en hielo. La mezcla de enzima-mAb se expuso a 5 % de suero con 3MC (deficiente de MASP-3) y $5x10^7$ de *S. aureus* muertos por calor en un volumen de reacción final de 50 μL. Las reacciones se incubaron a 37ºC durante 30 minutos y luego se tiñeron para detectar la deposición de C3b. Las células bacterianas teñidas se analizaron mediante un citómetro de flujo.

La **FIGURA 31** ilustra gráficamente las intensidades fluorescentes medias (MFI) de la tinción con C3b obtenidas de los tres anticuerpos representados en función de la concentración de mAb en el suero con 3MC con la presencia de rMASP-3. Como se muestra en la FIGURA 31, mAbD14 demuestra la inhibición de la deposición de C3b de una manera dependiente de la concentración. En contraste, ninguno de los mAb de control inhibió la deposición de C3b. Estos resultados demuestran que mAbD14 es capaz de inhibir la deposición de C3b dependiente de MASP-3. Se espera una actividad inhibidora mejorada para mAbD14 después de la maduración de afinidad continua de este anticuerpo para la unión de MASP-3 utilizando los factores anclados en el sistema DTLacO.

Resumen de los Resultados:

En resumen, los resultados en este Ejemplo demuestran un claro defecto del AP en suero deficiente para MASP-3. Por lo tanto, se ha demostrado que MASP-3 realiza una contribución crítica al AP, utilizando la activación del factor B y la

deposición de C3b como puntos finales funcionales. Además, la adición de MASP-3 funcional y recombinante, incluida la porción C-terminal catalíticamente activa de MASP-3, corrige el defecto en la activación del factor B y la deposición de C3b en el suero del paciente con 3MC. A la inversa, como se demostró en este Ejemplo, la adición de un anticuerpo MASP-3 (por ejemplo, mAbD14) en suero 3MC con rMASP-3 inhibe la deposición de C3b impulsada por AP. La observación de que MASP-3 recombinante, junto con C3, es suficiente para activar el factor B recombinante, demuestra un papel directo de la MASP-3 en la activación del Factor B y, por lo tanto, de la AP.

EJEMPLO 9

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

Métodos:

Se evaluó la capacidad de MASP-1 y MASP-3 recombinante para dividir dos versiones recombinantes diferentes de pro-factor D. La primera versión (pro-factor D-His) carece de una etiqueta N-terminal, pero tiene una etiqueta His C-terminal. Por lo tanto, esta versión del pro-factor D contiene el pro-péptido de 5 aminoácidos que se elimina por escisión durante la activación. La segunda versión (ST-pro-factor D-His) tiene una secuencia Strep-TagII en el extremo N, lo que aumenta el fragmento N-terminal escindido a 15 aminoácidos. El ST-pro-factor D también contiene una etiqueta His6 en el extremo C-terminal. La mayor longitud del propéptido de ST-pro-factor D-His mejora la resolución entre las formas escindidas y no escindidas por SDS-PAGE en comparación con la resolución posible con la forma pro-factor D-HIS.

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

Resultados

La **FIGURA 32** muestra el análisis de Western blot de la escisión del sustrato pro-factor D.

TABLA 14: Descripción de carril para Western Blot que se muestra en la FIGURA 32

Condiciones experimentales	**Carril 1**	**Carril 2**	**Carril 3**	**Carril 4**	**Carril 5**
Pro-Factor D	+	+	+	+	+

rMASP-3 (longitud completa)	-	+	_	_	_
rMASP-3a (S679A)	-	-	+	-	-
rMASP-1A (S646A)	-	-	-	+	-
rMASP-1 (CCP-1-CCP2-SP)	-	-	-	-	+

Como se muestra en la **FIGURA 32**, solo el fragmento MASP-3 de longitud completa (carril 2) y el fragmento de CCP1-CCP2-SP de MASP-1 (carril 5) escindieron el ST-pro-factor D-His6. El MASP-3 de longitud completa catalíticamente inactivo (S679A; carril 3) y el MASP-1 (S646A; carril 3) no pudieron escindir ninguno de los sustratos. Se obtuvieron resultados idénticos con el polipéptido pro-factor D-His6 (no mostrado). La comparación de un exceso molar de MASP-1 (CCP1-CCP2-SP) en relación con MASP-3 sugiere que MASP-3 es un catalizador más eficaz de la escisión pro-factor D que MASP-1, al menos en las condiciones descritas Aquí en.

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

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

Se llevó a cabo un ensayo para determinar el efecto inhibidor de mAbs de MASP-3 y MASP-1 representativos, identificados como se describe en el Ejemplo 7, sobre la escisión del factor D dependiente de MASP-3 de la siguiente manera. La proteína MASP-3 recombinante activa (80 ng) se incubó previamente con 1 µg de mAbs D14, M3M1 representativos y un anticuerpo de control (que se une específicamente a MASP-1, pero no a MASP-3) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió Pro-factor D con una etiqueta Strep N-terminal (ST-pro-factor D-His, 70 ng) y la mezcla se incubó a 37 ºC durante 75 minutos. A continuación, las reacciones se sometieron a electroforesis, se secaron y se tiñeron con antifactor D como se describe anteriormente.

La **FIGURA 33** es un Western blot que muestra la actividad inhibidora parcial de los mAbs D14 y M3M1 en comparación con una reacción de control que contiene solo MASP-3 y ST-pro-factor D-His (sin mAb; carril 1), así como un control reacción que contiene un mAb obtenido de la biblioteca DTLacO que se une a MASP-1, pero no a MASP-3 (carril 4). Como se muestra en la FIGURA 33, en ausencia de un anticuerpo inhibidor, MASP-3 escinde aproximadamente el 50% del pro-factor D en el factor D (carril 1). El anticuerpo específico de control de MASP-1 (carril 4) no cambia la proporción de pro-factor D al factor D. En contraste, como se muestra en los carriles 2 y 3, tanto el mAb D14 como el mAb M3M1 inhiben la escisión

dependiente de MASP-3 de pro-factor D a factor D, lo que resulta en una reducción en el factor D generado.

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

EJEMPLO 10

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

Antecedentes/Justificación:

Como se describe en los Ejemplos 5 y 6 de este documento, el efecto del suero deficiente de MASP-2 y MASP-3 en la lisis de glóbulos rojos de muestras de sangre obtenidas de un modelo de PNH de ratón demostró la eficacia de la inhibición de MASP-2 y/o inhibición de MASP-3 para tratar sujetos que padecen PNH, y también apoyó el uso de inhibidores de MASP-2 y/o inhibidores de MASP-3 (incluidos los inhibidores de MASP-2/MASP-3 duales o bi-específicos) para aminorar los efectos de hemólisis extravascular mediada por el fragmento C3 en sujetos con PNH sometidos a terapia con un inhibidor de C5 como eculizumab.

Como se describe en este Ejemplo, los experimentos de deposición de C3b y los experimentos de hemólisis se llevaron a cabo en suero deficiente de MASP-3 de pacientes con 3MC adicionales, confirmando los resultados obtenidos en los Ejemplos 5 y 6. Además, se llevaron a cabo experimentos que demostraron que la adición de rMASP-3 al suero con 3MC pudo reconstituir la deposición de C3b y la actividad hemolítica.

Métodos:

El suero deficiente en MASP-3 se obtuvo de tres pacientes con 3MC diferentes de la siguiente manera:

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

Paciente 2 con 3MC: tiene la mutación C1489T (H497Y) en el exón 12 de MASP-1, el exón que codifica el dominio de serina proteasa de MASP-3, lo que resulta en MASP-3 no funcional, pero proteínas funcionales MASP-1.

Paciente 3 con 3MC: tiene un defecto confirmado en el gen MASP-1, que resulta en MASP-3 no funcional y MASP-1 no funcional.

Experimento 1: Ensayo de deposición C3b

Se llevó a cabo un ensayo de AP en condiciones tradicionales específicas de AP (BBS/Mg^{++}/EGTA, sin Ca^{++}, en donde BBS = solución salina tamponada de barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11: 291-295 (1981), en placas de microtitulación recubiertas con zimosán a concentraciones séricas que oscilan entre el 0.5 y el 25% y la deposición de C3b se midió a lo largo del tiempo.

Resultados:

La **FIGURA 34** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en función de la concentración de suero en muestras de suero obtenidas de sujetos deficientes en MASP-3 (3MC), deficientes en C4 y deficientes en MBL. Como se muestra en la **FIGURA 34**, y se resume a continuación en la **TABLA 15**, los sueros de pacientes deficientes en MASP-3 del Paciente 2 y el Paciente 3 tienen actividad residual de AP en concentraciones altas (25 %, 12.5 %, concentraciones séricas de 6.25 %), pero significativamente más elevado el AP_{50} (es decir, 8.2 % y 12.3 % del suero necesario para alcanzar el 50 % de la deposición máxima de C3).

La **FIGURA 35A** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en condiciones "tradicionales" específicas de AP (es decir, BBS/EGTA/Mg^{++} sin Ca^{++}) como una función del tiempo en muestras de suero humano del 10 % obtenidas de sujetos humanos deficientes en MASP-3, C4y MBL.

La **TABLA 15** a continuación resume los resultados de AP_{50} mostrados en la **FIGURA 34** y los tiempos medios para la deposición de C3b mostrados en la **FIGURA 35A.**

TABLA 15: Resumen de los resultados mostrados en las **FIGURAS 34** y **35A**

Tipo de suero	**AP_{50} (%)**	**$T_{1/2}$ (min)**
Normal	4.5	26.3
MBL deficiente (MBL-/-)	5.7	27.5
C4 deficiente (C4-/-)	5.1	28.6
3MC (paciente 3)	8.2	58.2
3MC (Paciente 2)	12.3	72.4

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

Experimento #2: Análisis de la escisión de pro-factor D en sueros de pacientes con 3MC por Western Blot

Métodos: El suero se obtuvo del paciente #2 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) y de paciente #3 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)). Los sueros de pacientes, junto con los sueros de donantes normales (W), se separaron mediante gel de SDS-poliacrilamida y las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilidina. El pro-factor D humano (25,040 Da) y/o el factor D maduro (24,405 Da) se detectaron con un anticuerpo humano específico contra el factor D.

Resultados: Los resultados de Western blot se muestran en la FIGURA 35B. Como se muestra en la FIGURA 35B, en los sueros de donantes normales (W), el anticuerpo del factor D detectó una proteína de un tamaño compatible con el factor D maduro (24,405 Da). Como se muestra más adelante en la FIGURA 35B, el anticuerpo del factor D detectó una proteína ligeramente más grande en los sueros del paciente #2 (P2) con 3MC y del paciente ##3 (P3) con 3MC, consistente con la presencia de pro-factor D (25,040 Da) en estos pacientes con 3MC.

Experimento #3: Ensayos de complemento de Wieslab con sueros de pacientes con 3MC

Métodos: Sueros obtenidos del paciente #2 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) y del paciente #3 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)) también se probaron la actividad de la vía clásica, lectina y alternativa utilizando la pantalla del sistema de complemento de Wieslab (Euro-Diagnostica, Malmö, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El suero humano normal se probó en paralelo como control.

Resultados: La FIGURA 35C ilustra gráficamente los resultados de los ensayos Weislab classic, lectina y vías alternativas con plasma obtenido del paciente #2 con 3MC, paciente #3 con 3MC y suero humano normal. Como se muestra en la FIGURA 35C, bajo las condiciones del ensayo de Wieslab, las vías clásica, alternativa y MBL (lectina) son todas funcionales en el suero humano normal. En el suero del paciente #2 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+ /+)), la vía clásica y la vía de lectina son funcionales, sin embargo, no hay actividad de la vía alternativa detectable. En el suero del paciente #3 con 3MC (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), la vía clásica es funcional, sin embargo, no hay actividad de la vía de lectina detectable y no hay actividad de la vía alternativa detectable.

El resultado en las FIGURAS 35B y 35C apoya aún más nuestra comprensión de la función de MASP-1 y MASP-3 en las vías LEA-1 y LEA-2. Específicamente, la ausencia de la vía alternativa con una vía de lectina casi totalmente funcional en el suero del paciente 2, que carece solo de MASP-3, confirma que la MASP-3 es esencial para la activación de la vía alternativa. El suero del paciente 3, que carece tanto de MASP-1 como de MASP-3, ha perdido la capacidad de activar la vía de lectina así

como la vía alternativa. Este resultado confirma el requisito de MASP-1 para una vía funcional de LEA-2, y es consistente con el Ejemplo 7, y la literatura que demuestra que MASP-1 activa MASP-2. La aparente incapacidad de ambos sueros para activar el pro-factor D también es consistente con los datos descritos en el Ejemplo 9 que demuestran que MASP-3 escinde el pro-factor D. Estas observaciones son consistentes con las vías LEA-1 y LEA-2 como se diagraman en Figura 1.

Experimento #4: ensayo de hemólisis que analiza eritrocitos de conejo recubiertos con manano para la lisis en presencia de suero humano normal o con 3MC (en ausencia de Ca^{++})

Métodos:

Preparación de RBC de conejo en ausencia de Ca^{++} (es decir, utilizando EGTA)

La sangre completa de conejo (2 ml) se dividió en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 8000 rpm (aproximadamente 5.9 rcf) en una centrífuga eppendorf refrigerada a 4 °C. Elgránulo de glóbulos rojos se lavó tres veces después de volver a suspender en BBS/Mg^{++}/Ca^{++} helado (ácido barbitúrico de 4.4 mM, barbitona sódica de 1.8 mM, NaCl de 145 mM, pH 7.4, Mg^{++} de 5 mM, Ca^{++} de 5 mM). Después del tercer lavado, elgránulo se resuspendió en 4 ml de BBS/Mg^{++}/Ca^{++}. Los eritrocitos se granularon y los glóbulos rojos se lavaron con BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} como se describió anteriormente. La suspensión de RBC se almacenó en BBS/0.1 % de gelatina/Mg^{++}/Ca^{++} a 4 ºC. Luego, se diluyeron 100 µL de RBC suspendidos con 1.4 ml de agua y se centrifugaron a 8000 rpm (aproximadamente 5.9 rcf) durante 3 minutos y la OD del sobrenadante se ajustó a 0.7 a 541nm (una OD de 0.7 a 541nm corresponde a aproximadamente 10^9 eritrocitos/ml). Después de eso, se añadió 1 ml de los glóbulos rojos resuspendidos a una OD 0.7 a 9 ml de BBS/Mg^{++}/EGTA para lograr una concentración de 10^8 eritrocitos/ml. Las diluciones de los sueros o plasma de prueba se prepararon en BBS, Mg^{++}, EGTA helados y 100 µL de cada dilución de suero o plasma se pipeteó en el pocillo correspondiente de la placa de fondo redondo. Se añadieron 100 µl de RBC diluidos apropiadamente (10^8 eritrocitos/ml) a cada pocillo. Se usó nano-agua para producir el control positivo (100 % de lisis), mientras que se usó una dilución con BBS/Mg^{++}/EGTA sin suero o plasma como control negativo. La placa se incubó luego durante 1 hora a 37 ºC. La placa de fondo redondo se hizo girar a 3750 rpm durante 5 minutos. Luego, se transfirieron 100 µL del sobrenadante de cada pocillo a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano y se leyó OD a 415-490 nm.

Resultados:

La **FIGURA 36** ilustra gráficamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido

por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un rango de concentraciones séricas en suero de sujetos normales y de dos pacientes con 3MC (Paciente 2 y Paciente 3), medido en ausencia de Ca^{++}. Como se muestra en la **FIGURA 36**, se demuestra que la deficiencia de MASP-3 reduce el porcentaje de lisis mediada por complemento de eritrocitos recubiertos con manano en comparación con el suero humano normal. Las diferencias entre las dos curvas del suero humano normal y las dos curvas de los pacientes con 3MC son significativas (p = 0.013, prueba de Friedman).

La **TABLA 16** a continuación resume los resultados de AP_{50} mostrados en la **FIGURA 36**.

TABLA 16: Resumen de los resultados mostrados en la FIGURA 36

Tipo de Suero	**AP_{50} (%)**
Suero humano normal #1	7.1
Suero humano normal #2	8.6
Paciente #2 con 3MC	11.9
Paciente #3 con MC	14.3

Se observa que cuando las muestras de suero que se muestran en la **TABLA 16** se agruparon, el valor de AP_{50} para el suero humano normal = 7.9 y el valor de AP_{50} para el suero de 3MC = 12.8 (p = 0.031, prueba de rango con signo de pares emparejados de Wilcox).

Experimento N°5: La reconstitución del suero humano 3MC mediante MASP-3 recombinante restaura la deposición de C3b impulsada por AP en placas recubiertas con zimosán

Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo de AP en condiciones tradicionales específicas de AP (BBS / Mg^{++} / EGTA, sin Ca ++, en donde BBS= solución salina tamponada de barbital que contiene sacarosa), como se describe en Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11: 291-295 (1981)), sobre placas de microtitulación recubiertas con zimosán en las siguientes muestras de suero (1) 5% de suero humano del Paciente 3MC N°2 con rMASP-3 activo de longitud completa agregado en un rango de 0 a 20 µg / mL; (2) 10% de suero humano del Paciente 3MC N° 2 con rMASP-3 activo de longitud completa agregado en un rango de 0 a 20 µg/mL; y (3) 5% de suero humano del Paciente 3MC N° 2 con rMASP-3A inactivo (S679A) agregado en un rango de 0 a 20 µg / mL.

Resultados:

La **FIGURA 37** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por AP en placas de microtitulación recubiertas con zimosán en función de la concentración de proteína rMASP-3 agregada a las muestras de suero obtenidas de paciente humano 3MC N°2 (deficiencia de MASP-3). Como se muestra en la **FIGURA 37**, la proteína MASP-3 recombinante activa reconstituye la deposición de C3b impulsada por AP en placas recubiertas con zimosán de una manera dependiente de la concentración. Como se muestra más adelante en la **FIGURA 37**, no se observó deposición C3b en el suero 3MC que contiene rMASP-3 inactivo (S679A).

Experimento Nº6: La reconstitución del suero humano 3MC por MASP-3 recombinante restaura la actividad hemolítica en el suero de paciente 3MC

Métodos:

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

Resultados:

La FIGURA 38 ilustra gráficamente el porcentaje de hemólisis (medida por la liberación de hemoglobina de eritrocitos de conejo lisados en el sobrenadante medido por fotometría) de eritrocitos de conejo recubiertos con manano en un rango de concentraciones séricas en (1) suero humano normal; (2) suero de paciente 3MC; (3) suero de paciente 3MC más rMASP-3 de longitud completa activa (20 µg / ml); y (4) suero humano inactivado por calor, medido en ausencia de Ca ++. Como se muestra en la **FIGURA 38**, el porcentaje de lisis del RBC de conejo aumenta significativamente en el suero 3MC, incluido el rMASP-3 en comparación con el porcentaje de lisis en el suero 3MC sin el rMASP-3 ($p = 0,0006$).

La **FIGURA 39** ilustra gráficamente el porcentaje de lisis de eritrocitos de conejo en suero humano al 7% del Paciente 3MC 2 y del Paciente 3MC 3 que contiene rMASP-3 activo en un rango de concentración de 0 a 110 µg/ml en BBS/Mg^{++}/EGTA. Como se muestra en la **FIGURA 39**, el porcentaje de lisis del RBC de conejo se restaura con la cantidad de rMASP-3 de una manera dependiente de la concentración hasta el 100% de la actividad.

Experimento Nº7: El suero de paciente con deficiencia de MASP-3 (3MC) tiene MASP-2 funcional si MBL está presente

Métodos:

Se llevó a cabo un ensayo de deposición de C3b utilizando placas ELISA recubiertas con manano para examinar si el suero 3MC es deficiente en LEA-2. El plasma de citrato se diluyó en tampón BBS en diluciones en serie (comenzando a 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) y se colocó en placas recubiertas con manano. Se detectó que el C3b depositado utilizó un ensayo de C3b antihumano de pollo. La deposición de C3b impulsada por LEA-2 (las diluciones de plasma son altas para que AP y LEA-1 funcionen) en placas ELISA recubiertas con manano se evaluó en función de la concentración de suero humano en suero de un sujeto humano normal (NHS), de dos pacientes 3MC (Paciente 2 y Paciente 3), de los padres del Paciente 3 y de un sujeto con deficiencia de MBL.

Resultados:

La **FIGURA 40** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3b impulsada por LEA-2 (es decir, impulsada por MASP-2) en placas ELISA recubiertas con manano en función de la concentración de suero humano diluido en tampón BBS, para suero de un sujeto humano normal (NHS), de dos pacientes 3MC (Paciente 2 y Paciente 3), de los padres del Paciente 3 y de un sujeto con deficiencia de MBL. Estos datos indican que el Paciente 2 es suficiente de MBL. Sin embargo, el Paciente 3 y la madre del Paciente 3 tienen deficiencia de MBL y, por lo tanto, sus sueros no depositan C3b en manano a través de LEA-2. El reemplazo de MBL en estos sueros restaura la deposición de C3b mediada por LEA-2 en el suero del Paciente 3 (que es homocigoto para el SNP que conduce a la deficiencia de MASP-3) y su madre (que es heterocigótica para el alelo MASP-3 mutante) (datos no mostrados). Este hallazgo demuestra que el suero 3MC no es deficiente en LEA-2, sino que parece tener MASP-2 funcional.

Resumen general y conclusiones:

Estos resultados demuestran que la deficiencia de MASP-3 en el suero humano da como resultado la pérdida de la actividad de AP, como se manifiesta en la reducción de la deposición de C3b en los pozos recubiertos con zimosán y la reducción de la lisis de eritrocitos de conejo. El AP se puede restaurar en ambos ensayos complementando los sueros con MASP-3 humana recombinante funcional.

EJEMPLO 11

Este ejemplo demuestra que un anticuerpo monoclonal antihumano de MASP-3 de la región V de ratón de la región V/humana de IgG4 (mAb M3-1, también conocido como mAb 13B1) es un potente inhibidor de la activación del complemento de la vía alternativa mediada por MASP-3 (APC).

Métodos:

Generación de un anticuerpo monoclonal antihumano quimérico de MASP-3 de la región V de ratón /región constante humana de IgG (mAb M3-1)

Se generó un anticuerpo inhibidor antihumano murino de MASP-3 (mAb M3-1) mediante la inmunización de ratones knockout MASP-1/3 con el dominio MASP-3 CCP1-CCP2-SP humano (aa 301-728 de la SEQ ID NO: 2) (consultar también Ejemplo 14). Descrito brevemente, los esplenocitos de los ratones inmunizados se fusionaron con P3/NS1/1-Ag4-1 y los sobrenadantes de los clones de hibridoma resultantes se examinaron para determinar la producción de anticuerpos que se unen a MASP-3 humana y la capacidad de bloquear la escisión mediada de MASP-3 del pro-factor D del complemento (pro-CFD) al factor D (CFD). Las regiones variables del anticuerpo monoclonal (mAb) se aislaron mediante RT-PCR, se secuenciaron y se clonaron en vectores de expresión de IgG4 humanos. Los anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron en células HEK293T transfectadas transitoriamente, se purificaron y se probaron para determinar la afinidad de unión a MASP-3 humana y de ratón y para la capacidad de inhibir la escisión mediada por MASP-3 de pro-CFD a CFD.

El anticuerpo monoclonal inhibidor de MASP-3 M3-1 (13B1) comprende una región variable de la cadena pesada (VH) establecida como SEQ ID NO: 30 y una región variable de la cadena ligera (VL) establecida como SEQ ID NO: 45. Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo monoclonal de M3-1 se proporcionan a continuación:

Región variable de la cadena pesada

A continuación se presenta la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) para el mAb M3-1. Las CDR Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) están subrayadas, que corresponden a los residuos de aminoácidos 31-35 (H1), 50-66 (H2) y 99-102 (H3) de SEQ ID NO: 30.

mAb M3-1 región variable de la cadena pesada (VH) (SEQ ID NO: 30)

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGSTNYNEKFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSEDVWGTG

Región variable de la cadena ligera

A continuación, se presenta la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) para el mAb M3-1. Las CDR Kabat (24-34 (H1), 50-56 (H2) y 89-97 (H3) están subrayadas, que corresponden a los residuos de aminoácidos 24-40 (L1); 56-62 (L2) y 95-102 (L3) de SEQ ID NO: 45. Estas regiones son iguales ya sea que estén numeradas por el sistema de Kabat o Chothia.

mAb M3-1 región variable de la cadena ligera (VL) (SEQ ID NO: 45)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPTFGGGTK

CDRs de VH de mAb M3-1

VHCDR1: GKWIE (SEQ ID NO:84)

VHCDR2: EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)

VHCDR3: SEDV (SEQ ID NO:88)

CDRs de VL de mAb M3-1

VLCDR1: KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)

VLCDR2: WASTRES (SEQ ID NO:144)

VLCDR3: KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)

Como se muestra anteriormente, el anticuerpo monoclonal MASP-3 M3-1 comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende (i) VHCDR1 que comprende SEQ ID NO: 84, (ii) VHCDR2 que comprende SEQ ID NO: 86 y (iii) VHCDR3 que comprende SEQ ID NO: 88; y (b) una región variable de la cadena ligera que comprende (i) VLCDR1 que comprende SEQ ID NO: 142, (ii) VLCDR2 que comprende SEQ ID NO: 144 y (iii) VLCDR3 que comprende SEQ ID NO: 161.

Unión del mAb M3-1 a formas recombinantes de MASP-3 humana y de ratón

Una versión Fab monovalente de M3-1 se probó para determinar su unión a la proteína MASP-3 humana y de ratón de longitud completa recombinante en un

experimento ELISA. Las determinaciones de afinidad de unión se realizaron recubriendo placas de 96 pocillos con un anticuerpo de captura anti-MASP-3 que se une a la proteína de múltiples especies. Se ha demostrado que el anticuerpo de captura se une a la región CCP1-CCP2 de MASP-1 y MASP-3. Se inmovilizaron versiones completas de proteína humana y de ratón en placas ELISA recubiertas con el anticuerpo de captura, y se permitió que concentraciones variables de Fab M3-1 se unieran a la proteína objetiva en pocillos separados. La unión M3-1 se detectó utilizando un anticuerpo de la cadena ligera anti-kappa que se conjuga con HRP (Novus Biologicals NBP1-75064), y se visualizó con el conjunto de reactivos de sustrato TMB (BD Biosciences 555214).

La FIGURA 41 ilustra gráficamente un ejemplo representativo de un experimento de unión que se realizó con MASP-3 humana en el que el Fab M3-1 (también denominado 13B1) muestra una afinidad de unión aparente (EC_{50}) de aproximadamente 0.117 nM a la proteína humana.

La FIGURA 42 ilustra gráficamente un ejemplo representativo de un experimento de unión que se realizó con MASP-3 de ratón en el que el Fab M3-1 muestra una afinidad de unión aparente (EC_{50}) de aproximadamente 0.214 nM a la proteína de ratón.

Estos resultados demuestran que el mAb M3-1 (13B1) tiene una alta afinidad de unión para MASP-3 humano y de ratón.

Demostración de que el mAb M3-1 es capaz de inhibir la activación y medición del complemento de la vía alternativa (APC) de la potencia *in vitro* del mAb M3-1

Como se describe en la presente divulgación, se ha determinado que MASP-3 es un regulador clave de la APC, al menos en parte debido a su requisito para la activación de la CFD, una enzima central de la APC. Como también se describe en la presente divulgación, la MASP-3 circula en el cuerpo a una concentración relativamente baja y tiene una tasa catabólica lenta, lo que permite una inhibición duradera de la vía proinflamatoria a través de las vías intravenosa, subcutánea y oral de la administración de anticuerpos MASP-3. El siguiente experimento se llevó a cabo para determinar la eficacia del mAb M3-1 para inhibir la maduración de CFD mediada por MASP-3 y la inhibición de APC en suero humano. El suero humano normal contiene CFD predominantemente activo o procesado (es decir, maduro), por lo que realizamos experimentos en los cuales se reconstituyó suero humano agotado de CFD (Complement Technology A336) con una forma recombinante sin procesar de CFD

(pro-CFD). Por lo tanto, en este sistema experimental, la activación de APC requiere el procesamiento de pro-CFD en CFD activo.

La APC se indujo mediante la adición de partículas de zimosán, que funcionan como una superficie de activación para la deposición del complemento. Se agregaron concentraciones variables de mAb M3-1 al suero antes de la adición de pro-CFD recombinante y zimosán. Las mezclas se incubaron a 37 ° C durante 75 minutos, y la actividad de APC se midió mediante la detección por citometría de flujo del factor de complemento Bb (Quidel A252) en la superficie de las partículas de zimosán.

La FIGURA 43 ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor Bb del complemento en partículas de zimosán (determinada por la detección de citometría de flujo medida en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de mAb M3-1 en suero humano agotado de CFD. Como se muestra en la FIGURA 43, el mAb M3-1 muestra una potente inhibición de la APC en suero humano al 10%, con un IC_{50} de 0.311 nM en este ejemplo experimental.

Estos resultados demuestran que MASP-3 desempeña un papel clave en la activación de APC en un modelo *in vitro* en suero humano y además demuestra que el mAb M3-1 es un potente inhibidor de la APC.

Inhibición de la APC por mAb M3-1 *in vivo*:

Para determinar la eficacia del mAb M3-1 para inhibir la APC *in vivo*, un grupo de ratones (n = 4) recibió una única inyección intravenosa en la vena de la cola de 10 mg / kg del mAb M3-1. La sangre recogida de los animales se usó para preparar el suero, proporcionando una matriz para la evaluación citométrica de flujo de la actividad de APC en un ensayo *ex vivo* que mide el nivel de deposición de C3 (también C3b y iC3b) sobre partículas de zimosán. El suero preparado a partir de la sangre extraída en un punto de tiempo previo a la dosis y múltiples puntos de tiempo posteriores a la dosis (96 horas, 1 semana y 2 semanas) se diluyó al 7.5% y se agregaron partículas de zimosán para inducir la APC. Los ratones tratados con anticuerpos se compararon con un grupo de ratones de control (n = 4) que recibieron una dosis intravenosa única de vehículo.

La FIGURA 44 ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3 en partículas de zimosán en varios puntos de tiempo después de una dosis única de mAb M3-1 (10 mg / kg i.v.) en ratones de tipo salvaje. Como se muestra en la FIGURA 44, en el punto de tiempo previo a la dosis, las dos condiciones muestran niveles comparables de actividad de APC. A las 96 horas y los dos últimos puntos de tiempo, el grupo tratado con mAb M3-1 muestra una inhibición de APC esencialmente completa, mientras que la actividad de APC del grupo tratado con vehículo permanece sin

disminuir. Como se muestra en la FIGURA 44, una dosis única de mAb M3-1 administrada por vía intravenosa a ratones condujo a una ablación casi completa de la actividad sistémica de APC durante al menos 14 días.

Estos resultados demuestran que el mAb M3-1 es un potente inhibidor de la APC in vivo en un modelo de ratón.

EJEMPLO 12

Este ejemplo demuestra que el anticuerpo monoclonal anti-humano MASP-3 de la región V de ratón de la región V / humana IgG4 (mAb M3-1, también conocido como mAb 13B1) proporciona un beneficio claro para la supervivencia de los glóbulos rojos que carecen de Crry en un modelo de ratón asociado con hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH).

Métodos:

El anticuerpo monoclonal anti-humano MASP-3 de la región V de ratón de la región V / humana IgG4 (mAb M3-1) se generó como se describe en el Ejemplo 11 y el Ejemplo 14. Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 11, se determinó que el mAb M3-1 es un potente inhibidor de la APC en un modelo de ratón *in vivo*. Este ejemplo describe el análisis de mAb M3-1 para determinar la eficacia en un modelo murino asociado con PNH.

Análisis del mAb M3-1 para determinar la eficacia en un modelo murino asociado con PNH

En un modelo de ratón asociado con PNH, se obtuvieron glóbulos rojos (RBC) de ratones deficientes en Crry que carecen del principal represor de la superficie celular de la APC en ratones para su uso como células donantes. Los glóbulos rojos obtenidos de un ratón donante de tipo salvaje (WT) se ejecutaron en paralelo. Estos glóbulos rojos de los donantes se marcaron diferencialmente con tintes lipofílicos fluorescentes (Sigma): WT (rojo) y Crry- (verde). En dos experimentos diferentes, las células WT marcadas y las células donadoras de Crry se mezclaron 1:1 y se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores de tipo salvaje y se determinó el porcentaje de WT y la supervivencia de los glóbulos rojos deficientes en Crry (en relación con el momento inicial) en los ratones receptores. por evaluación de citometría de flujo de 20.000 eventos de células vivas. En el primer experimento, se administraron múltiples tratamientos de dosis previas del mAb M3-1, y el efecto del mAb M3-1 se comparó con el de otro anticuerpo inhibidor del complemento del mAb BB5.1 (disponible en Hycult Biotech), que es un anticuerpo inhibidor de C5 que ha mostrado eficacia en múltiples estudios con ratones (Wang et al., *PNAS* vol 92: 8955-

8959, 1995; Hugen et al., *Kidney Int* 71 (7): 646-54, 2007). La administración de un inhibidor de C5 es el estándar actual de tratamiento para pacientes humanos con PNH. En el segundo experimento, se evaluó una sola dosis del mAb M3-1 antes del tratamiento.

En el primer experimento, se evaluaron tres grupos diferentes de ratones (n = 4 por condición): condición tratada con vehículo, condición tratada con mAb M3-1 y condición tratada con mAb BB5.1 (mAb que bloquea el C5 del ratón). Las células marcadas se inyectaron en ratones el "día 0" y se administraron dosis múltiples de M3-1 y BB5.1 de la siguiente manera: se administró mAb M3-1 por vía intravenosa (10 mg / kg) en los días -11, -4 -1, y +6. El mAb BB5.1 se administró mediante inyección intraperitoneal (40 mg / kg) en los días -1, +3, +6 y +10. El tratamiento con vehículo siguió el mismo programa de dosificación que el mAb M3-1.

La FIGURA 45 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los glóbulos rojos del donante (WT o Crry-) durante un período de 14 días en ratones receptores de WT tratados con el mAb M3-1 (10 mg / kg en los días -11, 04, -1 y +6) , tratados con el mAb BB5.1, o ratones tratados con vehículo. Como se muestra en la FIGURA 45, en comparación con los glóbulos rojos WT que mostraron una supervivencia típica de los RBC en ratones en los animales tratados con vehículo, los RBC deficientes en Crry tuvieron un rápido aclaramiento (más del 75% se aclaró en 24 horas). El tratamiento en ratones con mAb BB5.1 no mejoró con respecto al tratamiento con vehículo en la supervivencia de RBC deficientes en Crry. En contraste, el tratamiento con el mAb M3-1 causó una mejora dramática de la supervivencia de glóbulos rojos deficientes en Crry tanto en el mAb BB5.1 como en animales tratados con vehículo. El efecto protector del mAb M3-1 se observó durante toda la duración del experimento.

En el segundo estudio, los glóbulos rojos marcados diferencialmente WT (rojo) y Crry (verde) se evaluaron en dos grupos diferentes de ratones WT (n = 4 por condición): tratados con vehículo y tratados con mAb M3-1. Se administró una dosis única de vehículo o anticuerpo (20 mg / kg) a los ratones receptores mediante administración intravenosa por seis días (día -6) antes de inyectar las células donantes marcadas en los ratones receptores. Los glóbulos rojos del donante marcados se analizaron para determinar el porcentaje de supervivencia en los ratones receptores en puntos de tiempo incrementales después de la inyección durante un período de 16 días.

La FIGURA 46 ilustra gráficamente el porcentaje de supervivencia de los glóbulos rojos del donante (WT o Crry-) durante un período de 16 días en ratones receptores de WT tratados con una dosis única de mAb M3-1 (20 mg / kg en el día -

6) o ratones tratados con vehículo. Como se muestra en la FIGURA 46, una dosis única de mAb M3-1 antes del tratamiento demostró una mejor supervivencia de glóbulos rojos Crry en comparación con la supervivencia de los glóbulos rojos Crry en ratones tratados con vehículo. A las 96 horas posteriores a la inyección, aproximadamente el 90% de los glóbulos rojos WT tratados con vehículo sobrevivieron bajo las condiciones de control, mientras que solo el 5% de los glóbulos rojos Crry sobrevivieron en los ratones WT tratados con vehículo. En contraste con los ratones tratados con vehículo, el 40% de los glóbulos rojos Crry sobrevivieron en los ratones tratados con mAb M3-1.

En conjunto, estos resultados demuestran que el mAb M3-1 del anticuerpo inhibidor de MASP-3 proporciona un beneficio claro para la supervivencia de los glóbulos rojos sin Crry, un inhibidor clave del complemento de la superficie en un modelo de ratón asociado con PNH.

EJEMPLO 13

Este ejemplo describe un estudio que demuestra que un anticuerpo monoclonal inhibidor de MASP-3 quimérico (mAb M3-1, también denominado mAb 13B1) reduce las puntuaciones clínicas en la artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA), un modelo murino de artritis reumatoide (RA).

Antecedentes/Justificación:

CAIA es un modelo animal bien establecido de artritis. Además de proporcionar información sobre la RA, la patología del modelo CAIA tiene una conexión establecida con el APC. Banda y sus colaboradores han demostrado mejores resultados en el modelo CAIA en ratones con deficiencias en componentes de la APC, como el factor B y el factor D (Banda et al., *J. Immunol* vol 177: 1904-1912, 2006 y Banda et al., *Clinical & Exp Imunol* vol 159: 100-108, 2009). Los ratones knockout de APC muestran puntuaciones de artritis (enfermedad) más bajas, menor incidencia y menos deposición de C3 y factor H en la membrana sinovial y en los tejidos circundantes en relación con los controles de WT. Además, las puntuaciones de actividad de la enfermedad, la deposición de tejido del complemento C3 en la articulación y las puntuaciones de lesión histopatológica disminuyeron notablemente en ratones knockout MASP1 / 3 (Banda et al., *J Immunol* vol 185: 5598-5606, 2010). Por lo tanto, el anticuerpo inhibidor de MASP-3 mAb M3-1 se analizó para determinar su eficacia en el CAIA.

Métodos:

El anticuerpo monoclonal de MASP-3 quimérico (mAb M3-1) se generó como se describe en el Ejemplo 11 y el Ejemplo 14. Como se describe en el Ejemplo 11, se determinó que el mAb M3-1 es un potente inhibidor de la APC en un modelo de ratón. *in vivo*.

El mAb M3-1 se probó en el modelo CAIA de la siguiente manera. Los ratones de tipo salvaje (n = 7) se inyectaron por vía intravenosa con 3 mg de un cóctel de anticuerpos anti-colágeno en el día 0. Los ratones se dosificaron por vía intraperitoneal con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (25 µg / ratón) en el día +3. Como se describe en Nandakumar et al. (*Am J Pathol* 163 (5): 1827-1837, 2003), la artritis generalmente ocurre en este modelo en los días +3 a +10. Se recogieron muestras terminales de suero el día +14. El mAb M3-1 (5 mg / kg y 20 mg / kg) se administró los días -12, -5, +1 y el día +7. El vehículo (PBS) se inyectó como control negativo.

Las puntuaciones clínicas se evaluaron para cada ratón en las 4 patas en los días de estudio 0 a 14 utilizando los siguientes estándares de puntuación:

0 = normal

1 = 1 articulación de la pata trasera y/o delantera afectada o eritema difuso mínimo e hinchazón

2 = 2 articulaciones de la pata trasera y/o delantera afectadas o eritema difuso leve e hinchazón

3 = 3 articulaciones de la pata trasera y/o delantera afectadas o eritema difuso moderado e hinchazón

4 = eritema difuso marcado e hinchazón, o articulaciones de 4 dígitos afectadas

5 = eritema difuso severo e hinchazón severa de toda la pata, incapaz de flexionar los dedos.

También se determinó la incidencia =% de ratones dentro de un grupo de tratamiento que mostraba síntomas artríticos.

Los resultados se muestran en la FIGURA 47 (puntuaciones clínicas) y en la FIGURA 48 (incidencia de artritis). La FIGURA 47 ilustra gráficamente las puntuaciones clínicas de los ratones tratados con mAb M3-1 (5 mg / kg o 20 mg / kg) o vehículo durante 14 días. La FIGURA 48 ilustra gráficamente el porcentaje de incidencia de artritis de los ratones tratados con mAb M3-1 (5 mg / kg o 20 mg / kg) o vehículo durante 14 días. Como se muestra en la FIGURA 47, el mAb M3-1 demuestra un beneficio terapéutico claro para ambos extremos a partir del día 5 y que dura todo el estudio. Como se muestra en la FIGURA 48, mientras que la incidencia de enfermedad alcanzó el 100% en los animales tratados con vehículo, dos tercios de los animales en la condición de 5 mg / kg de mAb M3-1 permanecieron libres de enfermedad. Además, solo uno de los animales (es decir, solo uno en un

total de n = 7) demostró algún síntoma artrítico en la condición de 20 mg / kg mAb M3-1.

Los resultados de este estudio demuestran que el anticuerpo mAb M3-1 inhibidor de MASP-3 proporciona un claro beneficio terapéutico en el modelo CAIA, un modelo murino bien establecido de artritis reumatoide (RA) y un modelo fuertemente vinculado a la activación de APC. Como se muestra en el Ejemplo 11, una dosis única del mAb M3-1 administrada por vía intravenosa a ratones condujo a una ablación casi completa de la actividad APC sistémica durante al menos 14 días. Como se muestra en este ejemplo, en el modelo animal inducido por la administración de autoanticuerpos contra el tejido conectivo del ratón, el mAb M3-1 redujo la incidencia y la gravedad de las puntuaciones de artritis clínica de una manera dependiente de la dosis. En comparación con los animales tratados con control, el mAb M3-1 redujo la incidencia y la gravedad de la enfermedad en aproximadamente el 80% con la dosis más alta probada. Por lo tanto, se espera que la administración de un anticuerpo inhibidor de MASP-3, como el mAb M3-1, sea una terapia efectiva en pacientes con artritis, como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la artritis reumatoide juvenil, la artritis relacionada con la infección, la artritis psoriásica, así como espondilitis anquilosante y enfermedad de Bechcet.

EJEMPLO 14

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad.

Antecedentes / Justificación:

Se ha descrito un número limitado de anticuerpos específicos para MASP-3 (Thiel et al., *Mol. Immunol*. 43: 122, 2006; Moller-Kristensen et al., *Int. Immunol*. 19: 141, 2006; Skjoedt et al., *Immunobiol* 215: 921, 2010). Estos anticuerpos fueron útiles para ensayos de detección tales como el análisis por Western blot, inmunoprecipitación y como reactivos de captura o detección en ensayos ELISA. Sin embargo, no se ha encontrado que los anticuerpos descritos en Thiel et al., 2006, Moller-Kristensen et al., 2006 y Skjoedt et al., 2010 inhiban la actividad catalítica de MASP-3.

Los anticuerpos MASP-3 también se generaron previamente, como se describe en el Ejemplo 7 de este documento (también publicado como Ejemplo 15 en el documento WO2013 / 192240) al seleccionar una biblioteca de anticuerpos de pollo en una línea celular DT40 modificada, DTLacO, para moléculas de unión de MASP-3. Estos anticuerpos se unieron a la MASP-3 humana en el rango nanomolar con una

EC_{50} entre 10 nM y 100 nM e inhibieron parcialmente la escisión de pro-CFD por la MASP-3.

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos inhibidores de MASP-3 humanos con una afinidad de unión inusualmente fuerte (es decir, afinidad de unión subnanomolar, que varía de ≤500 pM a 20 pM). Los anticuerpos descritos en este ejemplo se unen específicamente a la MASP-3 humana con alta afinidad (por ejemplo, ≤ 500 pM), inhiben la maduración del Factor D y no se unen a la MASP-1 humana (SEQ ID NO: 8).

Métodos:

1. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos antihumanos de MASP-3 de la región V de ratón/región constante humana de IgG

Se inmunizaron ratones knockout C57BL / 6, MASP-1/3 de siete a catorce semanas de edad con el polipéptido MASP-3 CCP1 / CCP2 / SP humano (residuos de aminoácidos 299-728 de la SEQ ID NO: 2) que incluye una etiqueta de epítopo StrepTag II en el extremo N-terminal; o se inmunizaron con el dominio MASP-3 SP humano (residuos de aminoácidos 450-728 de la SEQ ID NO: 2), incluida la marca de epitopo StrepTag II en el extremo N, utilizando el Sistema Sigma Adyuvante (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal con 50 µg de inmunógeno por ratón. Los ratones inmunizados se reforzaron 14 días después con inmunógeno adicional en adyuvante. Por lo tanto, durante varias semanas, los ratones se reforzaron cada 14 a 21 días con inmunógeno en PBS. Las muestras de suero de los ratones se prepararon periódicamente a partir de sangrados de la cola y se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos específicos de antígeno. Los ratones con un título de anticuerpos significativo recibieron un refuerzo de inmunógeno de pre-fusión en PBS cuatro días antes de la fusión esplénica. Tres días antes de la fusión, los ratones se trataron por vía subcutánea en la base de la cola con 50 µg de un mAb anti-CD40 en PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) para aumentar el número de células B (consultar Rycyzyn et al., *Hybridoma* 27: 25-30, 2008). Los ratones se sacrificaron y las células de bazo se recogieron y se fusionaron con una línea celular de mieloma murino P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) seleccionada (ATCC No. TIB18) utilizando un 50% de polietilenglicol o 50% de polietilenglicol más 10% de DMSO. Las fusiones generaron células de hibridoma que se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contenían medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de bazo. Después de la selección del hibridoma, los sobrenadantes del cultivo se analizaron para determinar

la unión de MASP-3 (ELISA) y la inhibición de la activación pro-Factor D. Los hibridomas positivos se identificaron y se subclonaron mediante métodos de dilución en serie.

TABLA 17: Resumen de expermientos de fusión

Fusión	Inmunógeno: MASP-3 humano	Hibridomas totales	Hibridomas de union de MASP-3	Hibridomas funcionales de MASP-3
1	SP	434	38	10
2	SP	279	13	0
3	CCP1/CCP2/SP	348	40	2
4	CCP1/CCP2/SP	319	60	2
5	CCP1/CCP2/SP	651	152	1
6	CCP1/CCP2/SP	1297	ND	1

Nota: "ND" significa que esta fusión solo se analizó para determinar la inhibición funcional de la activación pro-CFD.

Resultados:

Como se muestra en la TABLA 17, se seleccionaron un total de 3328 hibridomas de ratones MASP1/3 KO inmunizados, de los cuales > 303 se encontraron que se unían a MASP-3 y de los cuales 16 se unieron a MASP-3 e inhibieron la activación de pro-CFD. El mAb M3-1 (13B1) descrito en el Ejemplo 11 es uno de los 16 anticuerpos inhibidores funcionales de MASP-3 descritos en la TABLA 17. Como se describe en el Ejemplo 15, se determinó que los 16 anticuerpos inhibidores funcionales de MASP-3 se unen a la MASP humana. 3 con afinidad de unión inusualmente fuerte (≤ 500 pM).

Discusión:

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos que inhiben la MASP-3 humana con una afinidad de unión inusualmente fuerte (es decir, una afinidad de unión subnanomolar, que varía de ≤500 pM a 20 pM) mediante la inmunización de ratones knockout para MASP1/3. Los anticuerpos descritos en este Ejemplo se unen específicamente a la MASP-3 humana con alta afinidad (por ejemplo, ≤ 500 pM), inhiben la maduración del Factor D y no se unen a la MASP-1 humana. Como se describe en el presente documento, las secuencias de aminoácidos de MASP-3 humana, de ratón y de pollo revelaron que el dominio SP de MASP-3 está altamente conservado, especialmente en el sitio activo (consultar las FIGURAS 4 y 5). Es probable que la capacidad de generar anticuerpos inhibidores de MASP-3 con afinidad

de unión inusualmente fuerte en ratones KO MASP1 / 3, como se describe en este ejemplo, se deba en parte a evitar la tolerancia inmunológica que puede obstaculizar la generación de anticuerpos catalíticos de sitio específico para MASP-3 altamente potentes en animales de tipo salvaje.

EJEMPLO 15

Este ejemplo describe la clonación y el análisis de secuencia de los mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad.

Métodos:

Clonación y purificación de anticuerpos recombinantes:

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera se clonaron a partir de los hibridomas descritos en los Ejemplos 11 y 14 usando RT-PCR y se secuenciaron. Se produjeron mAbs quiméricos de ratón humano que consistían en las regiones variables de mAb de ratón fusionadas a la cadena pesada de IgG4 humana (SEQ ID NO: 311) y las regiones constantes de la cadena ligera kappa (SEQ ID NO: 313) se produjeron como proteínas recombinantes en células Expi293F. La región bisagra constante de IgG4 (SEQ ID NO: 311) contiene la sustitución de aminoácido S228P estabilizante. En una realización, los mAb quiméricos se fusionaron con la región bisagra constante de IgG4 humana (SEQ ID NO: 312) que contiene la sustitución de aminoácido S228P y también una mutación que promueve las interacciones FcRn a pH bajo.

Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera se muestran en las FIGURAS 49A y 49B, respectivamente ("SIN" = "SEQ ID NO:" en la FIGURA 49A y FIGURA 49B), y se incluyen a continuación. Las regiones de complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de cada una se proporcionan en las TABLAS 18-22 a continuación.

La **FIGURA 50A** es un dendrograma de las regiones VH de los mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad generados en ratones KO MASP1/3. La **FIGURA 50B** es un dendrograma de las regiones VL de mAbs inhibidores de MASP-3 antihumanos de alta afinidad generados en ratones KO MASP1 / 3. Como se muestra en las FIGURAS 50A y 50B, se identificaron varios grupos de anticuerpos relacionados.

A continuación, se presenta la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) para cada anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad. Las CDR de Kabat están subrayadas.

Regiones variables de la cadena pesada:

4D5 VH: SEQ ID Nº: 24

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTTDDINWVKQRPGQGLEWIGWIYPRDDRTKYN
DKFKDKATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSSLEDTYWGQGTLVAVSS

1F3 VH: SEQ ID Nº: 25

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGWIYPRDGSIKYNE
KFTDKATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSGVEDSYWGQGTLVTVSS

4B6 VH: SEQ ID Nº: 26

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGWIYPRDGTTKYN
EEFTDKATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSSVEDSYWGQGTLVTVSS

1A10 VH: SEQ ID Nº: 27

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGWIYPRDGTTKYN
EKFTDKATLTVDVSSSTAFMELHRLTSEDSAVYFCSSVEDSYWGQGTLVTVSS

10D12 VH: SEQ ID Nº: 28

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYAD
DFKGRFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTATYFCARGGEAMDYGGGGTSVTVSS

35C1 VH: SEQ ID Nº: 29

QIQLVQSGPELKTPGETVKISCKASGYIFTSYGITWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTTTYFCTRGGDALDYWGQGTSVTVSS

13B1 VH: SEQ ID NO:30

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGSTNYNE
KFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSEDVWGTGTTVTVSS

1G4 VH: SEQ ID NO:31

QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTFTGYWIEWIKQRPGQGLEWIGEMLPGSGSTHYN
EKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVRSIDYWGQGTTLTVSS

1E7 VH: SEQ ID NO:32

QVQLKQSGPELARPWASVKISCQAFYTFSRRVHFAIRDTNYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIY
PGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASGSHYFDYWGQGTTLTV
SS

2D7 VH: SEQ ID NO:33

EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDVNPNNDGTTYN
QKFKGRATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAICPFYYLGKGTHFDYWGQGTSLTVSS

49C11 VH: SEQ ID NO:34

EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKFTDYYMIWVKQSHGKSLEWIGVIKIYNGGTSYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGPSLYDYDPYWYFDVWGTGTTVTVS
S

15D9 VH: SEQ ID NO:35

QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCKASGYTFTAYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGTTNYNE
NFKDRATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARSYYYASRWFAFWGQGTLVTVSS

2F5 VH: SEQ ID NO:36

EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPGQGLEWIGDIYPGSGSTNYN
EKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRRYYATAWFAYWGQGTLVTVSS

1B11 VH: SEQ ID NO:37

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGSGNTYYNE
KFKGKATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARNYYISSPWFAYWGQGTLVTVSS

2F2 VH: SEQ ID NO:38

QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIGNFHPYNDDTKYN EKFKGKATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDDSAVYFCARRVYYSYFWFGYWGHGTLVTVSS

11B6 VH: SEQ ID NO:39

QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIGNFHPYNGDSKYN EKFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCARRHYAASPWFAHWGQGTLVTVSS

TABLA 18: Secuencias VH del anticuerpo MASP-3 (CDR y regiones FR, Kabat)

Anticuerpo	**HC FR1**	**HC CDR1**
4D5	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:55)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
1A10	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
10D12	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	QIQLVQSGPELKTPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:78)	SYGIT (SEQ ID NO:79)
13B1	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTF T (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
1G4	QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTF T (SEQ ID NO:90)	GYWIE (SEQ ID NO:91)
2F5	EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTF T (SEQ ID NO:97)	SYWIT (SEQ ID NO:98)
1B11	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:102)	DYYIN (SEQ ID NO:103)
1E7	QVQLKQSGPELARPWASVKISCQAFYTFS R (SEQ ID NO:108)	RVHFAIRDTNYWMQ (SEQ ID NO:109)
2F2	QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTF T (SEQ ID NO:113)	TYPIE (SEQ ID NO:114)
11B6	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTF T (SEQ ID NO:120)	TYPIE (SEQ ID NO:114)

2D7	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYTL T (SEQ ID NO:124)	DYYMN (SEQ ID NO:125)
49C11	EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKF T (SEQ ID NO:131)	DYYMI (SEQID NO:132)
15D9	QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCKASGYTF T (SEQ ID NO:136)	AYWIE (SEQ ID NO:137)
Anticuerpo	**HC FR2**	**HC CDR2**
4D5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
10D12	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	WVKQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:80)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
13B1	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
1G4	WIKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:92)	EMLPGSGSTHYNEKFKG (SEQ ID NO:93)
2F5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	DIYPGSGSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:99)
1B11	WVKQRPGQGLEWIA (SEQ ID NO:104)	RIYPGSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO:105)
1E7	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO:110)
2F2	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNDDTKYNEKFKG (SEQ ID NO:116)
11B6	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNGDSKYNEKFKG (SEQ ID NO:121)
2D7	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	DVNPNNDGTTYNQKFKG (SEQ ID NO:127)
49C11	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	VIKIYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:133)
15D9	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGSGTTNYNENFKD (SEQ ID NO:138)
Anticuerpo	**HC FR3**	**HC CDR3**
4D5	KATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSAVYFC SS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)

1F3	KATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSG (SEQ ID NO:64)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
4B6	KATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:68)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	KATLTVDVSSSTAFMELHRLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:70)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
10D12	RFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	RFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTTTYFCTR (SEQ ID NO:81)	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
13B1	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
1G4	KATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVR (SEQ ID NO:94)	SIDY (SEQ ID NO:95)
2F5	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:100)	RRYYATAWFAY (SEQ ID NO:101)
1B11	KATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR (SEQ ID NO:106)	NYYISSPWFAY (SEQ ID NO:107)
1E7	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS (SEQ ID NO:111)	GSHYFDY (SEQ ID NO:112)
2F2	KATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDDSAVYFCAR (SEQ ID NO:117)	RVYYSYFWFGY (SEQ ID NO:118)
11B6	KATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCAR (SEQ ID NO:122)	RHYAASPWFAH (SEQ ID NO:123)
2D7	RATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAI (SEQ ID NO:128)	CPFYYLGKGTHFDY (SEQ ID NO:129)
49C11	KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:134)	GPSLYDYDPYWYFDV (SEQ ID NO:135)
15D9	RATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAR (SEQ ID NO:139)	SYYYASRWFAF (SEQ ID NO:140)
Anticuerpo	**HC FR4**	
4D5	WGQGTLVAVSS (SEQ ID NO:61)	

1F3	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
4B6	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1A10	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
10D12	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
35C1	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
13B1	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
1G4	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F5	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1B11	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1E7	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F2	WGHGTLVTVSS (SEQ ID NO:119)	
11B6	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
2D7	WGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:130)	
49C11	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
15D9	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	

A continuación, se presentan las secuencias de la región variable de la cadena ligera (VL) para los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad. Las CDR de Kabat están subrayadas. Estas regiones son las mismas, ya sean numeradas por el sistema de Kabat o Chothia.

Regiones variables de la cadena ligera:

4D5_VL: SEQ ID NO:40

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

1F3_VL: SEQ ID NO:41

DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

4B6_VL: SEQ ID NO:42 (SAME for 1A10_VL)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKR

10D12_VL: SEQ ID NO:43

DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKLEIKR

35C1_VL: SEQ ID NO:44

DIVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

13B1_VL: SEQ ID NO:45

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPTFGGGTKLEIKR

1G4_VL: SEQ ID NO:46

DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQSLVQSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKR

1E7_VL: SEQ ID NO:47

DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIKR

2D7_VL: SEQ ID NO:48

DIQMTQTPASLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWYQQKPNGTVKLLVFYTSRLHSGVPSRFS
GSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFCQQGFTLPWTFGGGTKVEIKR

49C11_VL: SEQ ID NO:49

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASFSCRSSQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKR

15D9 VL: SEQ ID NO:50

DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCRASQNVGPNLAWYQQKPGQSPKALIYSASYRFSGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNRYPFTFGSGTKLEIKR

2F5 VL: SEQ ID NO:51

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLISSASNRYTGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELKR

1B11 VL: SEQ ID NO:52

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGPNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYNRYPLTFGAGTKLELKR

2F2 VL: SEQ ID NO:53

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCKASQNVGTHVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPRALTFGAGTKLELKR

11B6 VL: SEQ ID NO:54

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCKASQNVGPTVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFCQQYNSYPFTFGSGTKLEIKR

TABLA 19: Secuencias VL del anticuerpo MASP-3 (CDR y regiones FR, Kabat y Chothia)

Anticuerpo	**LC FR1**	**LC CDR1**
4D5	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1F3	DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSC (SEQ ID NO:148)	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
4B6	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
1A10*	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:151]	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:149]
10D12	DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
35C1	DIVMTQAPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:158)	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
13B1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1G4	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISC (SEQ ID NO:162)	RSSQSLVQSNGNTYLH (SEQ ID NO:163)
2F5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC (SEQ ID NO:168)	KASQNVGTAVA (SEQ ID NO:169)

1B11	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO:175)	KASQNVGPNVA (SEQ ID NO:176)
1E7	DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSC (SEQ ID NO:181)	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO:182)
2F2	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGTHVA (SEQ ID NO:188)
11B6	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGPTVA (SEQ ID NO:191)
2D7	DIQMTQTPASLSASLGDRVTISC (SEQ ID NO:195)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO:196)
49C11	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASFSC (SEQ ID NO:202)	RSSQSLIHSNGNTYLH(SEQ ID NO:203)
15D9	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC (SEQ ID NO:205)	RASQNVGPNLA (SEQ ID NO:206)
Anticuerpo	**LC FR2**	**LC CDR2**
4D5	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1A10	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:143]	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:144]

10D12	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
13B1	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1G4	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
2F5	WYQQKPGQSPKLLIS (SEQ ID NO:170)	SASNRYT (SEQ ID NO:171)
1B11	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
1E7	WYQQRTNGSPRLLIK (SEQ ID NO:183)	YASESIS (SEQ ID NO:184)
2F2	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
11B6	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
2D7	WYQQKPNGTVKLLVF (SEQ ID NO:197)	YTSRLHS (SEQ ID NO:198)
49C11	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
15D9	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRFS (SEQ ID NO:207)
Anticuerpo	**LC FR3**	**LC CDR3**

4D5	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
4B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1A10	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:150]	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:146]
10D12	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPYT (SEQ ID NO:160)
13B1	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
1G4	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPPT (SEQ ID NO:167)
2F5	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFC (SEQ ID NO:172)	QQYNSYPLT (SEQ ID NO:173)
1B11	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC (SEQ ID NO:179)	QQYNRYPLT (SEQ ID NO:180)
1E7	GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC (SEQ ID NO:185)	QQSNSWPYT (SEQ ID NO:186)
2F2	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNSYPRALT (SEQ ID NO:190)
11B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFC (SEQ ID NO:192)	QQYNSYPFT (SEQ ID NO:193)
2D7	GVPSRFSGSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFC (SEQ ID NO:199)	QQGFTLPWT (SEQ ID NO:200)
49C11	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPWT (SEQ ID NO:204)
15D9	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNRYPFT (SEQ ID NO:208)
Anticuerpo	**LC FR4**	
4D5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1F3	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
4B6	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	

1A10	[4B6 LC usado: SEQ ID NO:147]	
10D12	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
35C1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
13B1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1G4	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F5	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1B11	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1E7	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F2	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
11B6	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	
2D7	FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:201)	
49C11	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
15D9	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	

*Nota: la cadena ligera para el mAb 1A10 no se identificó, por lo que la cadena ligera del 4B6 se usó con el 1A10 HC.

TABLA 20: Secuencias de consenso para las CDR HC del grupo IA:

Anticuerpo	**Región**	**Secuencia**
4D5	HC-CDR1	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
1A10	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
Consenso	HC-CDR1	XXDIN (SEQ ID NO:209) donde X en la posición 1 es S o T; y X en la posición 2 es N o D
4D5	HC-CDR2	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	HC-CDR2	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
Consenso	HC-CDR2	WIYPRDXXXKYNXXFXD (SEQ ID NO:210) donde X en la posición 7 es G o D; X en la posición 8 es S, T o R; X en la posición 9 es I o T; X en la posición 13 es E o D; X en la posición 14 es K o E; X en la posición 16 es T o K
4D5	HC-CDR3	LEDTY (SEQ ID NO:60)
1F3	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)

4B6	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
Consenso	HC-CDR3	XEDXY (SEQ ID NO:211) donde X en la posición 1 es L o V, y donde X en la posición 4 es T o S

TABLA 21: Secuencias de consenso para los CDR LC del grupo IA:

Anticuerpo	**Región**	**Secuencia**
4D5	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
4D5-NQ	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
4D5-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
4D5-ST	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
1F3	LC-CDR1	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
4B6	LC-CDR1	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
Consenso*	LC-CDR1	KSSQSLLXXRTRKNYLX (SEQ ID NO:212) donde X en la posición 8 es N, I, Q o A; donde X en la posición 9 es S o T; y donde X en la posición 17 es A o S
4D5	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Consenso	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4D5	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
4B6	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
Consenso	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)

* Nota: el consenso de la CDR-L1 incluye variantes generadas como se describe en el Ejemplo 19.

TABLA 22 Secuencias de consenso para las CDR del grupo IB HC:

Anticuerpo	**Región**	**Secuencia**
10D12	HC-CDR1	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	HC-CDR1	SYGIT (SEQ ID NO:79)
Consenso	HC-CDR1	SYGXX (SEQ ID NO:213) donde X en la posición 4 es M o I; y donde X en la posición 5 es S o T
10D12	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
Consenso	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
10D12	HC-CDR3	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	HC-CDR3	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
Consenso	HC-CDR3	GGXAXDY (SEQ ID NO:214) donde X en la posición 3 es E o D; y donde X en la posición 5 es M o L

TABLA 23 Secuencias de consenso para las CDR del grupo IB LC:

Anticuerpo	**Región**	**Secuencia**
10D12	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
10D12-DE	LC-CDR1	KSSQSLLDSEGKTYLN (SEQ ID NO:261)
10D12-DA	LC-CDR1	KSSQSLLDSAGKTYLN (SEQ ID NO:262)
10D12-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Consenso *	LC-CDR1	KSSQSLLDSXXKTYLX (SEQ ID NO:215) donde X en la posición 10 es D, E o A; donde X en la posición 11 es G o A; y donde X en la posición 16 es N o S
10D12	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
Consenso	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
10D12	LC-CDR3	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	LC-CDR3	WQGTHFPYT (SEQ ID NO:160)
Consenso	LC-CDR3	WQGTHFPXT (SEQ ID NO: 216) donde X en la posición 8 es W o Y

* Nota: El consenso de la CDR-L1 incluye las variantes generadas como se describe en el Ejemplo 19.

ADN que codifica cadenas pesadas y ligeras de mAb de ratón:

SEQ ID NO:217: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 4D5 (parental)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACCGACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGC
CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGATAGAACTAAGTACAA

TGACAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTTCCAACACAGCGTACATG
GACCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAAGCCTCGAGGATA
CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCGCTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:218: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 1F3 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGC
CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGGAGTATTAAATATAA
TGAGAAATTCACGGACAAGGCCACATTGACAGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTACATG
GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAGGTGTCGAGGATT
CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:219: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 4B6 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAATTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAACAGAGGC
CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAA
TGAGGAGTTCACGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATG
GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTTCAAGTGTCGAGGATT
CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:220: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 1A10 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGC
CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAA
TGAGAAGTTCACGGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATG
GAGCTCCACAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAAGTGTCGAGGATT
CTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:221: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 10D12 (parental)
CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATC
TCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATTTTCACAAGCTATGGAATGAGCTGGGTGAGACAGGCTC
CAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATG

CTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGAACTCCCTATTTG
CAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGCGCAAGAGGGGGCGAA
GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:222: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 35C1 (parental)
CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGACGCCAGGAGAGACAGTCAAGATC
TCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATCTTCACATCCTATGGAATTACCTGGGTGAAACAGGCTC
CAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATG
CTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACGTCTGCCAGCACTGCCTATTT
GCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGACTACATATTTCTGTACAAGAGGGGGTGAT
GCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:223: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 13B1 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTT
TCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCACTGGCAAGTGGATAGAGTGGGTAAAACAGAGG
CCTGGACATGGCCTAGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAACTGGTAGTACTAACTACA
ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGACTCATCCTCCAACACAGCCTACAT
GCAACTCAGCAGCCTGACAACTGAAGACTCTGCTATGTATTATTGTTTAAGATCCGAGGAT
GTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:224: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 1G4 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTT
GCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCACTGGCTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGG
CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATGTTACCTGGAAGTGGTAGTACTCACTAC
AATGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACA
TGCAACTCAGCGGCCTGACAACTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGTAAGAAGCATAGA
CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:225: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 1E7 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGCAAGGCCTTGGGCTTCAGTGAAGATA
TCCTGCCAGGCTTTCTACACCTTTTCCAGAAGGGTGCACTTTGCCATTAGGGATACCAACT
ACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATCGGGGCTATTT

ATCCTGGAAATGGTGATACTAGTTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGC
AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCG
GTCTATTACTGTGCATCCGGTAGCCACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA
CAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:226: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 2D7 (parental)
GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGGCCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTA
TCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGCTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCC
ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATGTTAATCCTAACAATGATGGTACTACCTACAA
CCAGAAATTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTTCCAACACAGCCTCCATG
GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTACTACTGTGCAATATGCCCCTTTT
ATTACCTCGGTAAAGGGACCCACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTC
CTCA

SEQ ID NO:227: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 49C11 (parental)
GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGGGAAGATG
TCCTGTAAGGCTTCTGGATACAAATTCACTGACTACTATATGATCTGGGTGAAGCAGAGCC
ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAAAATTTATAACGGTGGTACGAGCTACAA
CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATG
GAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGCCATCTC
TCTATGATTACGACCCTTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGT
CTCCTCA

SEQ ID NO:228: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 15D9 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAACTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAACCTT
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACTGCCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG
CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTACTACTAACTACA
ATGAGAACTTCAAGGACAGGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACAT
GCAACTCAGCAGCCTGACAAGTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGATCCTATTAC
TACGCTAGTAGATGGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:229: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 2F5 (parental)

GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT
GTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAG
GCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACTAACTAC
AATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACA
TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGGAGAT
ACTACGCTACGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:230: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 1B11 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACTGACTACTATATAAACTGGGTGAAGCAGAGG
CCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGCAAGGATTTATCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACA
ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGAAAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT
GCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGAAATTACTAC
ATTAGTAGTCCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:231: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 2F2 (parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGACGCCTGGAGCCTCAGTGAAGAT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATCCTATAGAGTGGATGAAACAGAAT
CATGGAAAGAGCCTAGAGTGGATTGGAAATTTTCATCCTTACAATGATGATACTAAGTACA
ATGAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAAAAATCCTCTAACACAGTCTACTT
GGAGCTCAGCCGATTAACATCTGATGACTCTGCTGTTTATTTCTGTGCAAGGAGGGTCTAC
TATAGTTACTTCTGGTTTGGTTACTGGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:232: ADN que codifica la región variable de la cadena pesada 11B6 (Parental)
CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGAAACCTGGAGCCTCAGTGAAGATG
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATCCTATAGAGTGGATGAAGCAGAATC
ATGGGAAGAGCCTAGAGTGGATTGGAAATTTTCATCCTTACAATGGTGATTCTAAGTACAA
TGAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCTTGACTGTAGAAAAATCCTCTAGCACAGTCTACTTA
GAACTCAGCCGATTACCATCTGCTGACTCTGCTATTTATTACTGTGCAAGGAGGCACTACG
CTGCTAGTCCCTGGTTTGCTCACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

ADN que codifica la región variable de la cadena ligera (mAbs de ratón):

SEQ ID NO:233: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 4D5 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
TGACCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGA
ATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGTACA
CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:234: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 1F3 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAGGGTCACT
ATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAGAACCCGAAAGAACTATTTGTCTT
GGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGG
AATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CAGCAGTGTACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTGTAC
ACGTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:235: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 4B6/1A10 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
TGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAGAACCCGAAAGAACTATTTGTCTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGAA
TCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA
GCAGTGTACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTATAATCTGTACAC
GTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:236: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 10D12 (parental)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTG
TTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTG
GAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGAC
GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:237: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 35C1 (parental)

GATATTGTGATGACGCAGGCTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCA
TCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTGGTT
GTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCT
GGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGC
AGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACA
CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:238: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 13B1 (parental)
GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTA
TGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGA
ATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATATTCCGA
CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:239: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 1G4 (parental)
GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAACAAGCCTCCA
TCTCTTGCAGATCAAGTCAGAGCCTTGTACAAAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTAC
CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG
GGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCTCCGAC
GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:240: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 1E7 (parental)
GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTT
TCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACAA
ATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGG
TTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAG
ATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCGTACACGTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:241: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 2D7 (parental)

GATATCCAGATGACACAGACTCCAGCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCA
TCAGTTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTTTTAAACTGGTATCAACAGAAACCGAA
TGGAACTGTTAAACTCCTAGTCTTCTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGGAGCAGAGCATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAGGAAG
ATGTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTTTTACGCTTCCGTGGACGTTCGGTGGGGGCAC
CAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:242: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 49C11 (parental)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCTT
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACC
TGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGG
GGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAG
AGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:243: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 15D9 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAGGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCCAATTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAG
GGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGATTCAGTGGAGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAA
GACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGGTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGA
CAAAGTTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:244: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 2F5 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCA
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAG
GACAATCTCCTAAACTACTGATTTCCTCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAATATGCAGTCTGAA
GACGTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGA
CCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:245: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 1B11 (parental)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACTTCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAG

GGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAA
GACTTGGCAGACTATTTCTGTCAGCAATATAACCGCTATCCTCTCACGTTCGGTGCTGGGA
CCAAACTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:246: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 2F2 (parental)
GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAACG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTCATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAG
GGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGCGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAA
GACCTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCGAGCGCTCACGTTCGGTG
CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
SEQ ID NO:247: ADN que codifica la región variable de la cadena ligera 11B6 (parental)
GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAACG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCTACTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAG
GGCAATCTCCTAAAGCACTAATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCACTCTGAA
GACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGA
CAAAGTTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:310: región constante de IgG4 humana
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:311: región constante de IgG4 humana con mutación S228P
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:312: región constante de IgG4 humana con mutación S228P y también una mutación (Xtend) que promueve las interacciones FcRn a pH bajo
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALH
SHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:313: región constante de IgK humana
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

EJEMPLO 16

Este ejemplo describe la caracterización funcional de los anticuerpos inhibidores de MASP-3 purificados de alta afinidad recombinantes en varios ensayos *in vitro*.

Métodos:

Los mAbs MASP-3 recombinantes generados como se describe en los Ejemplos 11 y 14 se caracterizaron por (i) la unión a MASP-3 humana y MASP-3 de otras especies; (ii) la capacidad de inhibir la escisión de un sustrato artificial; (iii) la capacidad de inhibir la escisión pro-factor D a factor D; (iv) inhibición de la deposición del complemento en suero humano e (v) inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo en suero humano de la siguiente manera:

1. Ensayos para determinar la unión a MASP-3 humana y de ratón

Ensayos ELISA:

Ensayo de unión a MASP-3 con mAbs MASP-3 recombinantes purificados:

MASP-3 humano:

Se llevó a cabo un ensayo ELISA de tipo sándwich para medir la unión de 16 anticuerpos MASP-3 recombinantes purificados a MASP-3 humana (fragmento CCP1-

CCP2-SP) de la siguiente manera. Se recubrió una placa ELISA en tampón carbonato / bi-carbonato durante la noche a 4ºC con el anticuerpo de captura αM3-259 a 4 µg / mL. αM3-259 es un mAb MASP-3 humano-pollo quimérico recombinante de alta avidez de pollos inmunizados con la región CCP1-CCP2-SP de la MASP-3 humana. Los estudios de mapeo de dominios revelaron que αM3-259 se une a la región CCP1-CCP2 de MASP-3 de múltiples especies, incluyendo humanos, monos cynomolgus, ratones, ratas y perros. Como se muestra en la FIGURA 51C, αM3-259 también se une a MASP-1.

La placa se bloqueó posteriormente con BSA al 1% / PBS, se lavó en PBS y luego se incubó durante una hora a temperatura ambiente con MASP-3 CCP1-CCP2-SP (2 µg/mL). A continuación, la placa se lavó (PBS-T, 0.05%) y se agregaron los anticuerpos MASP-3 candidatos, seguido de una incubación durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó (PBS-T, 0.05%) y se añadió un anticuerpo de detección (kappa-HRP anti-humano de ratón, SouthernBiotech # 9230-05) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado (PBS-T, 0.05%), se desarrolló la placa (5 minutos) con OPT EIA TMB (BD Biosciences # 555214). La lectura de absorbancia a A450 se midió utilizando el lector de placas Spectramax M5e.

Resultados:

La **FIGURA 51A** y la **FIGURA 51B** ilustran gráficamente la avidez de los mAbs MASP-3 (recombinante purificado) para MASP-3 humana (CCP1-CCP2-SP). Como se muestra en la FIGURA 51A, la FIGURA 51B y la Tabla 24, los mAbs MASP-3 tienen una gran avidez por el MASP-3 humano, que varía de 0.241 nM a 0.023 nM. Estos valores son de 10 a 100 veces más bajos que los informados para los mAbs MASP-3 descritos anteriormente (consultar el Ejemplo 7 de este documento, también publicado como Ejemplo 15 en el documento WO2013 / 192240).

Especificidad de unión MASP-3 mAb:

Para determinar la especificidad de los mAbs de MASP-3 de alta afinidad para MASP-3, se llevaron a cabo experimentos de unión para medir la unión de 16 anticuerpos MASP-3 recombinantes purificados a MASP-1 humana y a MASP-2 humana. La unión se determinó como se describe para el ELISA de unión a MASP-3, excepto que MASP-1A recombinante (S646A, CCP1-CCP2-SP fragmento) y MASP-2 (CCP1-CCP2-SP fragmento) se inmovilizaron directamente sobre la placa.

Resultados:

La FIGURA 51C ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que se muestra que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 humanos recombinantes representativos purificados se muestran selectivos para la unión a MASP-3 y no se unen a MASP-1 humana.

La FIGURA 51D ilustra gráficamente los resultados de un experimento de unión en el que se muestra que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 humanos recombinantes purificados representativos purificados se muestran selectivos para la unión a MASP-3 y no se unen a MASP-2 humana.

Ratón MASP-3:

La unión de los mAbs de MASP-3 a MASP-3 de ratón se midió como se describió anteriormente para MASP-3 humana, excepto que se capturó MASP-3 de ratón de longitud completa (SEQ ID NO: 3) recombinante en la placa con αM3-259. El mAb de control negativo utilizado en ambos experimentos fue mAb77, un mAb recombinante, quimérico de pollo-humano obtenido de los mismos pollos inmunizados como αM3-259, sin embargo, el mAb 77 no se une a MASP-3 de ratón.

Resultados:

La **FIGURA 52** ilustra gráficamente la avidez de mAbs MASP-3 representativos (recombinante purificado) para MASP-3 de ratón de longitud completa. Como se muestra en la FIGURA 52, la mayoría de los mAbs MASP-3 probados también tienen una gran avidez por el MASP-3 de ratón.

Los valores de avidez (EC_{50}) de los 16 mAbs MASP-3 quiméricos recombinantes para MASP-3 humanos y de ratón se resumen en la TABLA 24.

TABLA 24: Avidez de unión de MASP-3 mAbs para MASP-3 humanos y de ratón (FIGURAS 51A, 51B y 52)

Clon anticuerpo	**Antígeno usado para generar mAb**	**MASP-3 humano (CCP1-CCP2-SP) Avidez de unión (EC_{50} nM)**	**MASP-3 de Ratón (longitud completa) Avidez de unión (EC_{50} nM)**
1A10*	SP	0.241	0.15
1B11	SP	0.059	1.10
1E7	SP	0.112	117.00
1F3	SP	0.236	0.111
1G4	SP	0.177	3.70
2D7	SP	0.122	NA
2F2	SP	0.057	0.105

2F5	SP	0.073	0.102
4B6	SP	0.211	0.188
4D5	SP	0.058	0.098
10D12	CCP1-CCP2-SP	0.089	0.081
11B6	CCP1-CCP2-SP	0.060	0.066
13B1	CCP1-CCP2-SP	0.059	0.035
15D9	CCP1-CCP2-SP	0.074	092
35C1	CCP1-CCP2-SP	0.091	0.209
49C11	CCP1-CCP2-SP	0.069	0.064

Tres de los mAbs-13B1, 10D12 y 4D5 de MASP-3 también se analizaron para determinar la unión a MASP-3 de mono cynomolgus, perro y rata recombinante. Estos resultados se resumen a continuación en la Tabla 25.

TABLA 25: Resumen de experimentos de unión de especies cruzadas MASP-3mAb

Especies de MASP-3	**Ranking de de unión de Fab**
Humano	13B1 (pM) ≈ 10D12 (pM) ≈ 4D5 (pM)
Mono cynomolgus	13B1 (pM) ≈ 4D5 (pM) > 10D12 (pM)
Perro	13B1 (pM) > 10D12 (pM) >> 4D5 (nM)
Rata	13B1 (pM) ≈ 10D12 (pM) >> 4D5 (nM)
Ratón	10D12 (pM) > 13B1 (pM) >> 4D5 (nM)

Como se muestra en la TABLA 25, los mAbs 13B1, 10D12 y 4D5 de MASP-3 se unen a las cinco especies de MASP-3 analizadas (humano, ratón, rata, perro y mono cynomolgus). Mientras que estos mAbs se unen a humanos con alta avidez (≤500 pM), se unen a otras especies de MASP-3 con avidez variable

2. Ensayo de escisión del tripéptido fluorógeno

Antecedentes/Justificación:

Además de sus sustratos naturales conocidos (Iwaki et al., *J. Immunol*. 187: 3751, 2011; Cortesio y Jiang, *Arch. Biochem. Biophys*. 449: 164-170, 2006), se ha

demostrado que MASP-3 se hidroliza. diversos sustratos tripeptídicos (Cortesio y Jiang, Ibid.). Como sustratos muy pequeños, estas moléculas se pueden usar para mapear el sitio catalítico de la proteasa. La inhibición de la escisión del tripéptido es una indicación de que un agente inhibidor, como un anticuerpo, bloquea directamente el acceso del pequeño sustrato al sitio catalítico o provoca un cambio conformacional en el dominio SP que niega el acceso de manera similar. Como tal, también se puede esperar que el anticuerpo bloquee la catálisis de los grandes sustratos naturales al interferir con el sitio activo de la enzima. Funcionalmente, esto se aproximaría lo más posible al ratón nulo MASP-3 o al paciente 3MC (deficiente en MASP-3).

Métodos:

Las titulaciones de los mAbs recombinantes (dilución 3 veces de 666 nM a 0.91 nM) se incubaron con MASP-3 CCP1-CCP2-SP (197 nM) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Sustrato tripeptídico BOC-V-P-R-AMC (t-butiloxicarbonil-Val-Pro-Arg-7-Amino-4-metilcumarina) (R&D Systems, Cat. No. ES011) se añadió a una concentración final de 0.2 mM. La hidrólisis del enlace amida Arg-AMC libera AMC, un grupo altamente fluorescente. Los valores de cinética de excitación de 380 nm / emisión de 460 nm se registraron cada 5 minutos a 37ºC durante 70 minutos utilizando el lector de placas de fluorescencia Spectramax M5e.

Resultados:

La **FIGURA 53** ilustra gráficamente los resultados del ensayo que mide la inhibición de la escisión del tripéptido fluorogénico dependiente de MASP-3 con los anticuerpos monoclonales MASP-3.

Como se muestra en la FIGURA 53, los mAbs MASP-3 probados se dividen en tres grupos diferentes:

1. Los mAbs de MASP-3 que son fuertes inhibidores de la escisión del péptido por MASP-3:1A10 (29.77 nM), 1G4 (29.64 nM), 1F3 (32.99 nM), 4B6 (26.03 nM), 4D5 (27.54 nM), 10D12 (30.94 nM) y 13B1 (30.13 nM).
2. Los mAb de MASP-3 que son inhibidores débiles o muy débiles de la escisión del péptido mediante MASP-3: 15D9, 11B6, 2F5, 1E7 y 2D7
3. Los mAbs de MASP-3 que son neutros o que parecen estimular la escisión del péptido mediante MASP-3: 1B11; 2F2; 77 (control del mAb)

3. Inhibición de Pro-Factor D a la escisión del Factor D

Métodos:

La proteína MASP-3 humana recombinante activa (240 ng por reacción) se incubó previamente con los mAb de MASP-3 representativos y un mAb de control (que se une a MASP-1 pero no a MASP-3) en un tampón GVB ++ con un volumen total de 9 µL a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se agregó 70 ng de pro-factor D con una etiqueta del epítopo Strep-tag II N-terminal (ST-pro-factor D-His) a cada tubo para alcanzar el volumen final por reacción a 10 µL. Las reacciones se incubaron en un termociclador a 37 ° C durante 6 horas. Una décima parte de cada reacción se sometió a electroforesis en un gel al 12% de Bis-Tris para resolver el pro-factor D y el producto de escisión del factor D activo. Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de PVDF y se analizaron mediante análisis por Western blot mediante detección con un anticuerpo de factor D biotinilado (R&D Systems).

Resultados:

La **FIGURA 54** muestra un análisis por Western blot que demuestra la capacidad de los mAb de MASP-3 representativos para bloquear la escisión mediada por MASP-3 recombinante de pro-CFD a CFD en un ensayo *in vitro*. Como se muestra en la FIGURA 54, los mAbs quiméricos 13B1, 4B6, 1G4, 2D7, 10D12, 1A10, 4D5, 1E7 y 1F3 de ratón-humano inhibidores de MASP-3 de alta afinidad representativos mostraron una inhibición de parcial a completa de la escisión de pro-CFD en este ensayo.

4. Deposición del factor Bb en el ensayo de zimosán

Métodos:
Se agregaron concentraciones variables de los mAb de MASP-3 a suero humano agotado de CFD al 10% (Complement Technology A336) y GVB + Mg / EGTA (20 nM) y se incubaron durante 30 minutos en hielo antes de la adición de ST-pro-factor D-His recombinante. (2 µg / mL final) y zimosán (0.1 mg / mL final). Las partículas de zimosán funcionan como una superficie activadora para la deposición del complemento. Las mezclas se incubaron a 37 ° C y la actividad de APC se midió mediante la detección por citometría de flujo del factor de complemento Bb (anticuerpo A252 de Quidel) en la superficie de las partículas de zimosán.

Resultados:

La FIGURA 55A ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor Bb en partículas de zimosán (determinada por la detección por citometría de flujo medida

en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de los mAb 1F3, 1G4, 2D7 y 4B6 de MASP-3 en suero humano agotado de factor D a 37 ° C durante 70 minutos.

La FIGURA 55B ilustra gráficamente el nivel de deposición del factor Bb en partículas de zimosán (determinada por la detección por citometría de flujo medida en unidades MFI) en presencia de concentraciones variables de los mAb 4D5, 10D12 y 13B1 de MASP-3 en suero humano agotado de CFD a 37 ° C durante 70 minutos. Los resultados mostrados en las FIGURAS 55A y 55B se resumen a continuación en la TABLA 26.

TABLA 26: Inhibición de la deposición del factor Bb en zimosán por los mAb de MASP-3 (FIGURA 55A y FIGURA 55B)

Anticuerpo	Inhibición de la deposición del factor Bb en Zymosan (IC_{50} nM)
1F3	0.1
1G4	1.1
2D7	3.5
4B6	0.2
4D5	0.4
10D12	0.5
13B1	0.3

Como se muestra en la FIGURA 55A, la FIGURA 55B y la TABLA 26, los mAb de MASP-3 muestran una potente inhibición de la APC en suero humano, con valores de IC_{50} que varían de 0.1 nM a 3.5 nM. Estos resultados demuestran que MASP-3 desempeña un papel clave en la activación de APC en un modelo *in vitro* en suero humano y además demuestra que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 son inhibidores potentes de la APC.

5. Ensayo para medir la capacidad de los mAb de MASP-3 representativos para inhibir la lisis de eritrocitos de conejo

Métodos:

Para controlar la inhibición de la APC en otro contexto experimental, evaluamos la capacidad de los mAb de MASP-3 representativos para bloquear la lisis de los eritrocitos de conejo en suero humano. Se agregaron concentraciones variables de los mAb de MASP-3 al 10% de suero humano agotado de factor D y GVB + Mg/EGTA (20 nM) y se incubaron durante 30 minutos en hielo antes de la adición de ST-pro-

factor B-His recombinante (2 µg/mL final) y eritrocitos ($2.5x10^8$ células/mL final). Las mezclas se incubaron a 37 ° C durante 70 minutos y la hemólisis mediada por APC se midió diluyendo las reacciones y midiendo la absorbancia (A405), que indica los niveles de hemoglobina libre.

Resultados:

La FIGURA 56A ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo en presencia de concentraciones variables de los mAb 1A10, 1F3, 4B6, 4D5, 1G4 y 2F2 de MASP-3 en suero humano agotado de CFD. La FIGURA 56B ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo en presencia de concentraciones variables de los mAb 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 y 2F5 de MASP-3 en suero humano agotado de CFD. Los resultados se resumen en la TABLA 27.

TABLA 27: Inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo por los mAb de MASP-3 (FIGURA 56A y FIGURA 56B)

Anticuerpo	**Inhibición de la lisis de eritrocitos de conejo (IC_{50} nM)**
1A10	0.2
1F3	0.2
4B6	0.2
4D5	0.1
1G4	2.7
2F2	0.8
1B11	NA
1E7	NA
2D7	5.4
2F5	0.9

Como se muestra en la FIGURA 56A, la FIGURA 56B y la TABLA 27, los mAb de MASP-3 muestran inhibición de la hemólisis dirigida por APC de eritrocitos de conejo, con valores de IC_{50} que varían de 0.1 nM a 5.4 nM. Estos resultados corroboran las observaciones de los anticuerpos de MASP-3 en el ensayo de zimosán, y demuestran además que los anticuerpos inhibidores de MASP-3 son inhibidores potentes de la APC.

6. Inhibición de la escisión de pro-factor D en suero de paciente 3MC

Métodos:

Se analizó un mAb de MASP-3 recombinante representativo (4D5) para determinar la capacidad de bloquear la escisión (y activación) de MASP-3 recombinante de pro-factor D que se origina a partir de suero humano normal y suero de 3MC Paciente B ("Pat B"), un individuo que no tiene MASP-3 detectable en el suero y manifiesta una deficiencia en la APC.

El suero humano normal y el suero del paciente B (10% final) y GVB + Mg / EGTA (30 nM) se incubaron sin enzima o con MASP-3 recombinante activo (rMASP-3; 0.5 µg / mL), rMASP-3 inactivo, o rMASP-3 más mAb 4D5 de MASP-3 (500 nM final) en hielo durante 1 hora. Se añadió zimosán (0.1 mg / ml final) y las mezclas se incubaron a 37ºC. Después de 2 horas, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron. Las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpo de cabra producido en relación al Factor D humano (R&D Systems AF1824), se desnaturalizaron y se trataron con Péptido-N-Glicosidasa (New England Biolabs P0704L). Las proteínas capturadas y desglicosiladas se resolvieron con SDS-PAGE y los geles se sometieron a electrotransferencia para el análisis por Western blot con un anti-CFD biotinilado (R&D Systems BAF1824) y estreptavidina-HRP de alta sensibilidad (Thermo Fischer Scientific 21130).

Resultados:

La FIGURA 57 muestra un análisis por Western blot que analiza el nivel de pro-factor D y factor D en suero de 3MC paciente B en presencia de rMASP-3 activo, rMASP-3 inactivo y rMASP-3 activo más mAb 4D5. Como se muestra en la FIGURA 57, el suero humano normal contiene predominantemente la forma madura, mientras que el suero del Paciente B contiene principalmente la forma de zimógeno del factor D. Como se muestra además en la FIGURA 57, el rMASP-3 activo en presencia de zimosán causa la escisión del pro-factor D en el suero del Paciente 3, mientras que la forma inactiva (zimógeno) de MASP-3 no lo hace. Finalmente, como se muestra en la FIGURA 57, el mAb 4D5 de MASP-3 bloquea la escisión del pro-factor D en el suero del Paciente 3 en presencia de rMASP-3 activo. Estos resultados demuestran además el papel de MASP-3 en la escisión del pro-factor D en la activación de la APC, y demuestran que un mAb inhibidor de MASP-3 es capaz de bloquear la escisión del pro-factor D mediada por MASP-3 y, por lo tanto, bloquear el APC.

EJEMPLO 17

Análisis de los mAbs 10D12 y 13B1 inhibidores de MASP-3 representativos para la capacidad de inhibir el APC *in vivo*.

1. Inhibición de la APC por mAb M3-1 (13B1) y 10D12 *in vivo*:

Métodos:
Para determinar la eficacia del mAb 13B1 y 10D12 (M3-1) de MASP-3 para inhibir la APC *in vivo*, un grupo de ratones (n = 4) recibió una inyección intravenosa única en la vena de la cola de 10 mg / kg de mAb 13B1 y un segundo grupo de ratones (n = 4) recibió una única inyección intravenosa en la vena de la cola de 10 mg / kg de mAb 10D12. La sangre recolectada de los animales se usó para preparar el suero, proporcionando una matriz para la evaluación por citometría de flujo de la actividad de APC en un ensayo *ex vivo* que mide el nivel de deposición de C3 (también C3b y iC3b, Dako F020102-2) sobre partículas de zimosán. El suero preparado a partir de la sangre extraída en un punto de tiempo previo a la dosis y múltiples puntos de tiempo posteriores a la dosis (96 horas, 1 semana y 2 semanas) se diluyó al 7.5% y se agregaron partículas de zimosán (0.1 mg / ml final) para inducir la APC . Los ratones tratados con anticuerpos se compararon con un grupo de ratones de control (n = 4) que recibieron una dosis intravenosa única de vehículo.

Resultados:
La **FIGURA 58** ilustra gráficamente el nivel de deposición de C3 en partículas de zimosán en diversos puntos de tiempo después de una dosis única de mAb M3-1 (13B1), mAb 10D12, o vehículo en ratones de tipo salvaje. Como se muestra en la FIGURA 58, en el punto de tiempo previo a la dosis, las tres condiciones muestran niveles comparables de actividad de APC. A las 96 horas y los dos puntos de tiempo posteriores, ambos grupos tratados con mAb muestran una ablación casi completa de la actividad sistémica de APC, mientras que la actividad de APC del grupo tratado con vehículo permanece sin disminuir.
Estos resultados demuestran que mAb M3-1 (13B1) y mAb 10D12 de MASP-3 son inhibidores potentes de la APC *in vivo* en ratones.

2. Estado del factor B en ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3

Métodos:
Durante la conversión del zimógeno del Factor B a una enzima proteolítica activa, el Factor B se divide en los fragmentos Ba (~ 30 kDa) y Bb (~ 60 kDa) por el Factor D.

El estado del fragmento Ba en suero de ratón obtenido de ratones tratados con el mAb 10D12 de MASP-3 se determinó de la siguiente manera.

Los ratones (n = 4) recibieron dos inyecciones intravenosas en la vena de la cola de 10 mg/kg de mAb 10D12. Los tratamientos se realizaron con siete días de diferencia y la sangre se extrajo de los animales tres días después de la segunda inyección. Un segundo grupo de cuatro ratones recibió una dosis intravenosa única de vehículo (PBS). La sangre recolectada de ambos grupos se utilizó para preparar el suero, proporcionando una matriz para la activación del complemento. Las partículas de zimosán (0.1 mg/mL final) se agregaron a suero diluido (7,5% final) y se incubaron durante 35 minutos a 37 ° C.

Los resultados:

Como medida de activación de APC, la **FIGURA 59** muestra una técnica de análisis por Western Blot que analiza el estado del fragmento Ba en suero de ratón obtenido de ratones tratados con mAb 10D12 o PBS y estimulados con zimosán. Cada carril en la FIGURA 59 representa un ratón diferente, y los carriles se alternan para mostrar el suero de un ratón vehículo representativo adyacente a un ratón tratado con mAb de MASP-3 con el propósito de comparación. Dos condiciones de control, de ratones tratados con vehículo o mAb 10D12 se muestran en los carriles 1 y 2, respectivamente (comenzando desde el lado izquierdo de la transferencia) como representantes del nivel basal de Ba presente en las muestras de suero en ausencia de zimosán. Todos los carriles 3 a 10 muestran el nivel de fragmento Ba presente después de la incubación con zimosán. En todos los casos, los ratones tratados con mAb de MASP-3 demuestran un nivel reducido del fragmento Ba en comparación con los animales tratados con vehículo.

3. El suero de ratones tratados con mAb 10D12 inhibe la hemólisis

Métodos:
Como otra medida de la inhibición de APC por los anticuerpos inhibidores de MASP-3, evaluamos la capacidad de los anticuerpos de MASP-3 para bloquear la lisis de eritrocitos de conejo en suero de ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3 en comparación con el suero de ratones tratado con control vehículo.

Los ratones (n=4/grupo) recibieron tres inyecciones intravenosas en la vena de la cola del control del vehículo (PBS), 10 mg/kg de mAb 10D12 de MASP-3, o 25 mg /

kg de mAb 10D12 de MASP-3. Los tratamientos se realizaron con siete días de diferencia y se recolectó la sangre de los animales tres días después de la tercera inyección. Esta sangre se utilizó para preparar el suero, proporcionando una matriz para las reacciones de hemólisis. Se añadieron eritrocitos (2.5 x 10^8 células/ml final) al suero combinado al 20% de cuatro ratones en GVB + Mg/EGTA (20 nM). Las mezclas se incubaron a 37 ° C y la hemólisis mediada por APC se midió diluyendo las reacciones y midiendo la absorbancia (A405).

Resultados:

La **FIGURA 60** ilustra gráficamente el nivel de inhibición de la hemólisis en suero al 20% de ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3 (10 mg/kg o 25 mg/kg) o ratones tratados con control de vehículo. Como se muestra en la FIGURA 60, el suero de ratones tratados con mAb 10D12 de MASP-3 a 10 mg/kg y 25 mg/kg demostró menos hemólisis general durante el período de prueba de 1 hora en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Resumen general de los resultados:
Como se describe en este ejemplo, los mAbs 13B1 y 10D12 inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad inhiben la APC *in vivo*. Como se describe en el Ejemplo 12, se determinó que el anticuerpo 13B1 monoclonal de MASP-3 (también denominado mAb M3-1) proporciona un beneficio claro para la supervivencia de los glóbulos rojos sin Crry en un modelo de ratón asociado con hemoglobinuria nocturna paroxística (PNH) . Como se describe en el Ejemplo 13, se determinó que el mAb M3-1 de MASP-3 redujo la incidencia y la gravedad de las puntuaciones de la artritis clínica de una manera dependiente de la dosis.

EJEMPLO 18

Este ejemplo describe los resultados del análisis de unión a epítopo de los mAb inhibidores de MASP-3 de alta potencia.

1. Análisis competitivo de enlace

Métodos:

Se recubrieron placas de ensayo ELISA de 96 pocillos con el anticuerpo de captura, αM3-259, un mAb de isotipo IgG4 que se ha demostrado que se une a la región CCP1-CCP2 de MASP-1 y MASP-3. La proteína MASP-3 humana de longitud

completa se inmovilizó en la placa mediante el anticuerpo de captura αM3-259. En pocillos separados no recubiertos, se mezcló una serie de dilución doble de un mAb de MASP-3 de prueba de un isotipo IgG4 con una concentración constante de otro anticuerpo de MASP-3 de prueba de un isotipo IgG1. La mezcla se añadió a los pocillos recubiertos y se dejó que se uniera a la MASP-3 capturada. La competencia potencial entre los dos anticuerpos se determinó mediante la detección de la isoforma IgG1 usando un anticuerpo conjugado con HRP contra la región bisagra de IgG1 humana (Southern Biotech 9052-05) y un conjunto de reactivos de sustrato TMB (BD Biosciences 555214).

Resultados:

Las FIGURAS 61A-61E ilustran gráficamente los resultados del análisis competitivo de enlace.

La FIGURA 61A ilustra gráficamente los resultados del análisis competitivo de unión para identificar los mAb de MASP-3 (IgG4) que bloquean la interacción entre el mAb 4D5 (IgG1) y MASP-3 humana.

La FIGURA 61B ilustra gráficamente los resultados del análisis competitivo de unión para identificar los mAb de MASP-3 (IgG4) que bloquean la interacción entre el mAb 10D12 (IgG1) y MASP-3 humana.

La FIGURA 61C ilustra gráficamente los resultados del análisis competitivo de unión para identificar los mAb de MASP-3 (IgG4) que bloquean la interacción entre el mAb 13B1 (IgG1) y MASP-3 humana.

La FIGURA 61D ilustra gráficamente los resultados del análisis competitivo de unión para identificar los mAb de MASP-3 (IgG4) que bloquean la interacción entre el mAb 1F3 (IgG1) y MASP-3 humana.

La FIGURA 61E ilustra gráficamente los resultados del análisis competitivo de unión para identificar los mAb de MASP-3 (IgG4) que bloquean la interacción entre el mAb 1G4 (IgG1) y MASP-3 humana.

Los datos desde la FIGURA 61A al 61E se resumen a continuación en la TABLA 28.

Estos datos indican que los mAb 4D5, 10D12, 13B1, 1A10, 1F3 y 1G4 de MASP-3 comparten un epítopo común o epítopes superpuestos en MASP-3 humana. Sorprendentemente, 1G4 tiene una capacidad muy limitada para bloquear la unión de los otros cinco mAb a MASP-3, pero esos mAb bloquean casi la unión de 1G4 a MASP-3 por completo.

2. Análisis de la unión de mAb a péptidos que representan epítopos de MASP-3 lineales y discontinuos

Métodos:
Pepscan evaluó catorce de los 16 mAbs de MASP-3 para identificar las regiones de MASP-3 a las que se unen. Para reconstruir los epítopos discontinuos tanto lineales como potenciales de la molécula objetiva, se sintetizó una biblioteca de péptidos correspondiente a los residuos de aminoácidos 299 a 728 de la SEQ ID NO: 2 (MASP-3 humana). Los residuos de aminoácidos 1-298 de MASP-3 no estaban presentes en el inmunógeno y no se incluyeron en este análisis.

El análisis de epítopo de Pepscan incluyó el uso de la tecnología CLIPS, que fija estructuralmente los péptidos en estructuras tridimensionales definidas (consultar Timmerman et al., *J Mol Recog*. 20: 283-299, 2007 y Langedijk et al., *Analytical Biochemistry* 417: 149- 155, 2011). La unión de cada anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA basado en Pepscan.

Resultados:
Los resultados de la unión del péptido de Pepscan para cada anticuerpo analizado se describen a continuación y se resumen en la TABLA 4, TABLA 28 y FIGURAS 62-67.

Los anticuerpos 1F3, 4B6, 4D5 y 1A10 (Grupo IA)

Cuando se probaron en condiciones de severidad moderada, los anticuerpos 1F3, 4B6, 4D5 y 1A10 se unieron a los imitadores de epítopos discontinuos y también se unieron a los imitadores lineales y restringidos simples. El análisis de los datos demuestra que los anticuerpos 1F3, 4B6, 4D5 y 1A10 reconocen predominantemente el estiramiento peptídico $_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SEQ ID NO: 9) de MASP-3. Este péptido se encuentra inmediatamente adyacente a la histidina del sitio activo, H497. Los datos obtenidos para estos anticuerpos con imitadores discontinuos sugieren que el estiramiento peptídico $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SEQ ID NO: 11),

$_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SEQ ID NO: 13) y $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SEQ ID NO: 14) de MASP-3 también contribuye a la unión. El péptido $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SEQ ID NO: 11) contiene el aspartato del sitio activo (D553).

Anticuerpo 10D12 (Grupo IB)

Cuando se probaron en condiciones de severidad moderada, el anticuerpo 10D12 se unió a los péptidos con la secuencia central $_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SEQ ID NO: 9) de MASP-3, la secuencia adyacente a la histidina del sitio activo, H497.

Anticuerpo 13B1 (Grupo IC)

Cuando se probó en condiciones de severidad moderada, el anticuerpo 13B1 reconoce un epítopo discontinuo que comprende estiramientos peptídicos $_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SEQ ID NO: 10) y $_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SEQ ID NO: 12) de MASP-3, donde el estiramiento peptídico $_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SEQ ID NO: 12) parece ser la parte dominante del epítopo, ya que también puede unir en forma restringida simple. El péptido $_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SEQ ID NO: 10) incluye el histidina del sitio activo, H497.

Anticuerpo 1G4 (Grupo II)

Cuando se analiza en condiciones de baja severidad, el anticuerpo 1G4 reconoce un epítope discontinuo que comprende estiramientos de péptidos $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO: 17), $_{514}$EHVTVYLGLH$_{52}$3 (SEQ ID NO: 19) (SEQ ID NO: 23) de MASP-3, donde el estiramiento peptídico $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ es la parte dominante del epítope. El péptido dominante se encuentra dentro de los tres aminoácidos de la serina del sitio activo, S664.

Anticuerpos 1E7 y 2D7 (Grupo IIIA)

Cuando se probaron en condiciones de rigurosidad alta y baja, respectivamente, los anticuerpos 1E7 y 2D7 reconocen un epítope discontinuo que comprende los estiramientos de péptidos $_{454}$RNAEPGLFPWQ464 (SEQ ID NO: 17), $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SEQ ID NO: 19) y $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO: 23) -3, donde el tramo peptídico $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO: 23) es la parte dominante del epítope y se encuentra dentro de los tres aminoácidos de la serina del sitio activo, S664.

Anticuerpos 2F5 y 15D9 (Grupo IIIB)

Cuando se prueban en condiciones de baja severidad, los anticuerpos 2F5 y 15D9 reconocen predominantemente un epítope discontinuo que comprende estiramientos peptídicos $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO: 17), $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SEQ ID NO: 18), $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SEQ ID NO: 20) y $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:

23) de MASP-3. Los péptidos $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SEQ ID NO: 18) y $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO: 23) se localizan dentro de cuatro o tres aminoácidos de los residuos del sitio activo H497 y S664, respectivamente.

Anticuerpo 1B11 (Grupo IIIC)

Cuando se probó en condiciones de severidad moderada, el anticuerpo 1B11 reconoce un epítope discontinuo que comprende los estiramientos peptídicos $_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SEQ ID NO: 16), $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO: 17), $_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SEQ ID NO: 21) y $_{614}$SDVLQLVPL$_{623}$ (SEQ ID NO: 22) de MASP-3.

TABLA 28: Resumen del análisis de enlace de epítopo

Ref. N°/Grupo de mAb de MASP-3	**Fragmentos de unión a péptidos (epítopos) en MASP-3 humana (con líder)**	**Compite con**	**Ensayo de escisión de péptidos**
4D5 Grupo IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
1F3 Grupo IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
4B6 Grupo IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
1A10 Grupo IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
10D12 Grupo IB	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
13B1 Grupo IC	$_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:10) $_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SIN:12)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe

Secuencia central del grupo I	$_{498}$VLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:15)		
1G4 Grupo II: competencia cruzada con el Grupo I y III.	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	inhibe
1E7 Grupo III A	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1G4	Inhibe débilmente
2D7 Grupo IIIA	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		Inhibe débilmente
2F5 Grupo IIIB	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$(SIN 18) $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		Sin efecto
15D9 Grupo IIIB	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$(SIN 18) $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		Sin efecto
1B11 Grupo IIIC	$_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SIN:16) $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SIN:21) $_{614}$SDVLQYVKLP$_{623}$ (SIN:22)		estimula
Secuencia central para el Grupo II y el Grupo III	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17)		
2F2 Grupo IV	Epítopo de unión no determinado	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	estimula
11B6 Grupo IV	Epítopo de unión no determinado	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	Sin efecto

La FIGURA 62 proporciona un diagrama esquemático que muestra las regiones de contacto en MASP-3 humano mediante los mAb de MASP-3, según lo determinado

por análisis Pepscan. Como se muestra en la FIGURA 62, todos los mAb de MASP-3 tienen regiones de contacto en la cadena beta que contiene el dominio SP de MASP-3. Un mAb, 1B11, también tiene una región de contacto entre los dominios CCP2 y SP en la cadena alfa de MASP-3.

Las FIGURAS 63A a 67 muestran modelos en 3D que ilustran las regiones de contacto de los mAb de MASP-3 de alta afinidad en los dominios CCP1/2/SP de MASP-3 humano, en donde el sitio activo del dominio SP de MASP-3 está orientado hacia el frente y la tríada catalítica se muestran como cadenas laterales.

La FIGURA 63A muestra las regiones de contacto entre los mAbs 1F3, 4D5 y 1A10 de MASP-3 humano y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 498-509 (SEQ ID NO: 9), residuos aa 544-558 (SEQ ID NO: 11).), residuos aa 639 a 649 (SEQ ID NO: 13) y residuos aa 704 a 713 (SEQ ID NO: 14).

La FIGURA 63B muestra las regiones de contacto entre MASP-3 humano y el mAb 10D12 de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 498 a 509 (SEQ ID NO: 9).

La FIGURA 64 muestra las regiones de contacto entre la MASP-3 humano y el mAb 13B1 de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 494 a 508 (SEQ ID NO: 10) y los residuos aa 626 a 638 (SEQ ID NO: 12).

La FIGURA 65 muestra las regiones de contacto entre la MASP-3 humano y el mAb 1B11 de MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 435 a 447 (SEQ ID NO: 16), residuos aa 454 a 464 (SEQ ID NO: 17), residuos aa 583 a 589 (SEQ ID NO: 21) y residuos aa 614 a 623 (SEQ ID NO: 22).

La FIGURA 66 muestra las regiones de contacto entre los mAb 1E7, 1G4 y 2D7 de MASP-3 humano y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 454 a 464 (SEQ ID NO: 17), y los residuos 514 a 523 (SEQ ID NO: 19).) y aa residuos 667 a 678 (SEQ ID NO: 23).

La FIGURA 67 muestra las regiones de contacto entre los mAb 15D9 y 2F5 de MASP-3 humano y MASP-3 de alta afinidad, incluidos los residuos aa 454 a 464 (SEQ ID NO: 17), y los residuos aa 479 a 493 (SEQ ID NO: 18), residuos aa 562 a 571 (SEQ ID NO: 20), y residuos aa 667 a 678 (SEQ ID NO: 23).

En resumen, se obtuvieron perfiles de unión concluyentes para 12 de los 14 anticuerpos. Los 12 anticuerpos mapeados reconocieron epítopos expuestos a solventes dentro del dominio peptidasa S1. La proximidad de varios de los determinantes del epítopo a los residuos para la tríada catalítica del sitio activo (H497, D553, S664) es consistente con un modelo en el que los mAb de MASP-3 inhibidores de alta afinidad bloquean la actividad enzimática al interferir con la interacción enzima-sustrato.

EJEMPLO 19

Este ejemplo describe la humanización de los mAb de MASP-3 representativos y la ingeniería de posibles sitios de modificación postralacional.

Métodos:

1. Humanización de los mAb de MASP-3 representativos de alta afinidad

Métodos:

Para reducir el riesgo de inmunogenicidad, se humanizaron los anticuerpos 4D5, 10D12 y 13B1 inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad mediante un método de injerto de CDR. Las CDRS de cada anticuerpo MASP-3 se injertaron en las secuencias del marco de consenso humano más cercanas. Algunos de los residuos de la zona de Vernier fueron modificados por la mutagénesis dirigida al sitio de Quickchange (Agilent Technologies). Las regiones VH y VL humanizadas resultantes se transfirieron a los productos de expresión de IgG1 o IgG4 e IgK humana basados en pcDNA3.1, y los anticuerpos recombinantes se expresaron y se purificaron como se describe anteriormente. La afinidad de los anticuerpos humanizados se determinó mediante ELISA utilizando fragmentos Fab monovalentes, y la potencia se evaluó mediante el ensayo de deposición de C3 utilizando formatos de IgG4 intactos.

Resultados:

Las secuencias de aminoácidos de las versiones humanizadas representativas de las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera para los mAb 4D5, 10D12 y 13B1 se proporcionan a continuación. Las CDR (Kabat) están subrayadas.

4D5:

h4D5_VH-14 (SEQ ID NO:248)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRDDRTKYN
DKFKDKATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSLEDTYWGQGTLVTVSS

h4D5_VH-19 (SEQ ID NO:249)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPRDDRTKYN
DKFKDRATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSLEDTYWGQGTLVTVSS

h4D5_VL-1 (SEQ ID NO:250)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR
10D12:

h10D12_VH-45 (SEQ ID NO:251)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYA
DDFKGRFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAVYFCARGGEAMDYWGQGTLVTVSS

h10D12_VH-49 (SEQ ID NO:252)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYA
DDFKGRFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTATYFCARGGEAMDYWGQGTLVTVSS

h10D12_VL-21 (SEQ ID NO:253)
DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTKVEIKR
13B1

h13B1_VH-9 (SEQ ID NO:254)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGTGSTNYA
QKFQGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLRSEDVWGQGTLVTVSS

h13B1_VH-10 (SEQ ID NO:255)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGTGSTNYN
EKFKGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLRSEDVWGQGTLVTVSS

h13B1_VL-1 (SEQ ID NO:256)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

La afinidad de los anticuerpos 4D5, 10D12 y 13B1 humanizados representativos para MASP-3 humano se muestra a continuación en la TABLA 29.

TABLA 29: Unión de los mAb de MASP-3 humanizados representativos a MASP-3

Clon de anticuerpos MASP-3 (formato Fab)	**Unión a MASP-3 EC_{50} humana (nM)**
Fab Parental 4D5	0.107
Fab h4D5_14-1 (VH-14 y VL-1)	0.085
Fab h4D5_19-1 (VH-19 and VL-1)	0.079
Fab Parental 10D12	0.108
Fab h10D12_45-21 (VH-45 y VL-21)	0.108
Fab h10D12_49-21 (VH-49 y VL-21)	0.115
Fab parental 13B1	0.123
Fab h13B1_9-1 (VH-9 y VL-1)	0.101
Fab h13B1_10-1 (VH-10 y VL-1)	0.097

El porcentaje de identidad de las secuencias de marco humanizadas con respecto a las secuencias de marco de la línea germinal humana:

h4D5_VH-14=90%; h4D5_VH-19=91%; h4D5_VL-1=100%;
h10D12_VH-45=92%; h10D12_VH-49=91%; h10D12_VL-21=93%;
h13B1_VH-9=95%; h13B1_VH-10=94%; h13B1_VL-1=100%

2. Mutagénesis de los mAb de MASP-3 representativos para eliminar sitios

de modificación de Asn/Asp en CDR-1 de la región variable de la cadena ligera de 4D5, 10D12 y 13B1

Los mAb 4D5, 10D12 y 13B1 inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad se analizaron para determinar la modificación postralacional. Los residuos de asparagina con un motivo posterior de glicina, serina, histidina, alanina o asparagina (motivo "NG", "NS", "NH", "NA" o "NN") a menudo son susceptibles a la hidrólisis del grupo amida de la cadena lateral de Asparagina o "desamidación". Los residuos de ácido aspártico con una glicina o prolina (motivo "DG" o "DP" sucesivos) a menudo son susceptibles a la interconversión o "isomerización". Dichas modificaciones dan lugar a la heterogeneidad de la carga y pueden afectar la función del anticuerpo. Si se producen en una interfaz de enlace. También pueden aumentar los riesgos de fragmentación, inmunogeneticidad y agregación.

Los posibles motivos de modificación postralacional se identificaron en la CDR-1 de las regiones variables de la cadena ligera de 4D5, 10D12 y 13B1.

Los anticuerpo 4D5 y 13B1 contenían un posible sitio de desamidación de Asn en CDR1 de la cadena ligera (mostrado como "NS" en las posiciones 8 y 9 de la SEQ ID NO: 142 subrayada en la TABLA 30 a continuación. Como se muestra más adelante en la Tabla 30, el anticuerpo 10D12 contenía una posible sitio de isomerización de Asp en CDR1 de la cadena ligera.

Las variantes de la versión humanizada de estos mAb de MASP-3 se generaron mediante mutagénesis dirigida al sitio como se muestra en la TABLA 30. Las variantes se expresaron y se purificaron como se describió anteriormente. La afinidad se determinó mediante ELISA utilizando fragmentos Fab monovalentes, y la potencia se evaluó mediante el ensayo de deposición de C3 utilizando formatos de IgG4 intactos como se describió anteriormente.

TABLA 30: Variantes del CDR-L1 for 4D5, 10D12 and 13B1

Anticuerpo	Región	Secuencia
4D5 Parental	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
4D5-NQ Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
4D5-NA Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
4D5-ST Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)

13B1 Parental	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
13B1-NQ	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
13B1-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
13B1-ST	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
Consenso para 4D5, 13B1 y variantes.	LC-CDR1	KSSQSLLXXRTRKNYLA (SEQ ID NO:260) Donde X en la posición 8 es N, Q o A; y en la que X en la posición 9 es S o T
10D12 Parental	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
10D12-DE Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLDSEGKTYLN (SEQ ID NO:261)
10D12-DA Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLDSAGKTYLN (SEQ ID NO:262)
10D12-GA Mutante	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Consenso de 10D12, 35C1 y variantes.	LC-CDR1	KSSQSLLDSXXKTYLX (SEQ ID NO:215) Donde X en la posición 10 es D, E o A; Donde X en la posición 11 es G o A; y en donde X en la posición 16 es N o S

TABLA 31: Unión de candidatos mutagenizados de los mAb 4D5, 10D12 y 13B1 humanizados a MASP-3 humano

Clon de anticuerpo MASP-3 (formato Fab)	**Unión al MASP-3 humano EC_{50} (pM)**
Fab parental h4D5_19-1 (VH-19 y VL-1)	102
Fab h4D5-19-1-NQ (VH-19 y VL-1-NQ)	732
Fab h4D5-19-1-NA (VH-19 y VL-1-NA)	122
Fab h4D5-19-1-ST (VH-19 y VL-1-ST)	151

Fab parental h10D12_45-21 (VH-45 and VL-21)	108
Fab h10D12-45-21-DE (VH-45 y VL-21-DE)	326
Fab h10D12-45-21-DA (VH-45 y VL-21-DA)	294
Fab h10D12-45-21-GA (VH-45 y VL-21-GA)	181
Fab parental h13B1_10-1 (VH-10 and VL-1)	100
Fab h13B1_10-1-NQ (VH-10 and VL-1-NQ)	138
Fab h13B1_10-1-NA (VH-10 y VL-1-NA)	105
Fab h13B1_10-1-ST (VH-10 y VL-1-ST)	120

TABLA 32: Secuencias VH humanizadas con anticuerpo de MASP-3 (CDR y regiones FR, Kabat)

Anticuerpo	**HC FR1**	**HC CDR1**
4D5 Parental (SIN:24)	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
h4D5_VH-14 (SIN:248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
h4D5_VH-19 (SIN:249)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
10D12 Parental (SIN:28)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12_VH-45 (SIN:251)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12-VH-49 (SIN:252)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)

13B1 Parental (SIN:30)	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_VH-9 (SIN:254)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_VH-10 (SIN:255)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
Anticuerpo	**HC FR2**	**HC CDR2**
4D5 Parental	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH-14	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH-19	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
10D12 Parental	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12_VH-45	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12-VH-49	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
13B1 Parental	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
h13B1_VH-9	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYAQKFQG (SEQ ID NO:275)
h13B1_VH-10	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
Anticuerpo	**HC FR3**	**HC CDR3**
Parental 4D5	KATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
h4D5_VH-14	KATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSS (SEQ ID NO:266)	LEDTY (SEQ ID NO:60)

h4D5_VH-19	RATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSS (SEQ ID NO:267)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
10D12 Parental	RFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12_VH-45	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO:270)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12-VH-49	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTATYFCAR (SEQ ID NO:271)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
13B1 Parental	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_VH-9	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_VH-10	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
Anticuerpo	**HC FR4**	
4D5 Parental	WGQGTLVAVSS (SEQ ID NO:61)	
h4D5_VH-14	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
h4D5_VH-19	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
10D12 Parental	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
h10D12_VH-45	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
h10D12-VH-49	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
13B1 Parental	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	

h13B1_VH-9	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	
h13B1_VH-10	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	

Regiones variables de la cadena ligera humanizadas representativas con variantes:

h4D5_VL-1-NA (SEQ ID NO:278)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIKR

h10D12_VL-21-GA (SEQ ID NO:279)

DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDAKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWTFGQGTKVEIKR

h13B1_VL-1-NA (SEQ ID NO:280)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTFGQGTKVEIKR

TABLA 33: Secuencias VL humanizadas con anticuerpo de MASP-3 (CDR y regiones FR, Kabat) [más variantes en LC-CDR1]

Anticuerpo	**LC FR1**	**LC CDR1**
4D5 Parental (SIN:40)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1 (SIN:250)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1-NA (SIN:278)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
10D12 Parental (SIN:43)	DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21 (SIN:253)	DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21-GA (SIN:279)	DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)

13B1 Parental	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h13B1_VL-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
h13B1_VL-1-NA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
Anticuerpo	**LC FR2**	**LC CDR2**
4D5 Parental	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)

h4D5_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h4D5_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
10D12 Parental	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21-GA	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
13B1 Parental	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Anticuerpo	**LC FR3**	**LC CDR3**
4D5 Parental	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAE DLAVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)

10D12 Parental	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
h10D12_VL-21	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC (SEQ ID NO:286)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
h10D12_VL-21-GA	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC (SEQ ID NO:286)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
13B1 Parental	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)

Anticuerpo	**LC FR4**	
4D5 Parental	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h4D5_VL-1	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	
h4D5_VL-1-NA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	
10D12 Parental	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h10D12_VL-21	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:287)	
h10D12_VL-21-GA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:287)	
13B1 Parental	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h13B1_VL-1	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	

h13B1_VL-1-NA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	

EJEMPLO 20

Análisis de un mAb 13B1 inhibidor de MASP-3 representativo en un modelo de esclerosis múltiple en ratones.

Antecedentes/Justificación: La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un trastorno autoinmune inflamatorio y desmielinizante adquirido, es un modelo animal establecido de esclerosis múltiple (MS). La evidencia sugiere que la APC juega un papel importante en el desarrollo/progresión de la EAE fue proporcionada por informes de que la enfermedad se atenúa en ratones tratados con un anticuerpo neutralizante del factor B (Hu et al., *Mol. Immunol*. 54: 302, 2013). Este ejemplo describe el análisis de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 representativo de alta afinidad, 13B1, en el modelo EAE.

Métodos:

Inducción EAE:

En este estudio se utilizó un kit para inducir EAE, adquirido de Hooke Laboratories (Lawrence, MA) para inducir EAE. Este kit contenía el neuroantígeno MOG_{35-55} en adyuvante completo de Freund (CFA), así como la toxina pertusis.

Se utilizaron 30 ratones C57 Bl / 6J hembra de tipo salvaje para este estudio y se aclimataron a la instalación durante al menos una semana antes de la inducción de EAE. Los ratones tenían aproximadamente 10 semanas de edad en el momento de la inducción. Como se muestra en la TABLA 34 a continuación, en el momento de la inducción, cada ratón recibió dos inyecciones subcutáneas (sc) de 100 µL de MOG_{35-55} y una inyección intraperitoneal (ip) de 100 µL (400 ng) de toxina pertusis. Se administró una segunda inyección de toxina pertusis 24 horas después de la primera.

Tratamiento: Los 30 ratones se dividieron en tres grupos de 10 y se trataron con un mAb de control de isotipo irrelevante de 10 mg / kg (v.v.); mAb 13B1 (anti-MASP-3, 10 mg / kg i.v.) o mAb 1379 (anti-Factor B (*Hu et al., Mol. Immunol*. 54: 302, 2013) 40 mg / kg i.p.). Como se muestra en la TABLA 34, la dosificación con el mAb y mAb 13B1 de MASP-3 de control de isotipo y ocurrió semanalmente comenzando en el Día -16 y finalizando en el Día +12. La dosificación con mAb 1379 ocurrió cada dos días desde el Día +3 hasta el Día +11, según el programa de dosificación descrito en Hu et al., *Mole Immunol* 54: 302-308, (2013).

TABLA 34: Métodos experimentales para el experimento EAE con MASP-3 mAb 13B1

Día de administración	Toxina Pertusis 400 ng i.p.	Péptido MOG 35-55 250 µg	mAb 1379 (anti-Factor B) 40 mg i.p.	mAb de Control Isotipo 10 mg/kg i.v.	mAb 13B1 (anti-MASP-3) 10 mg/kg i.v.
-16				+	+
-9				+	+
-2				+	+
0	+	+			
+1	+				
+3			+		
+5			+	+	+
+7			+		
+9			+		
+11			+		
+12				+	+

Puntuación: Los ratones se revisaron cada dos días hasta la aparición de los síntomas, después de lo cual se revisaron diariamente. Los primeros signos de enfermedad aparecieron 7-12 días después de la inmunización, como se esperaba. Los ratones se puntuaron según la escala mostrada a continuación en la TABLA 35.

TABLA 35: Criterios de puntuación del modelo EAE

Puntuación	**Observaciones clínicas**
0.0	No hay cambios evidentes en las funciones motas del ratón en comparación con los ratones no inmunizados. Cuando se levanta por la base de la cola, la cola tiene tensión y está erecta. Las patas traseras generalmente se separan. Cuando el ratón está caminando, no hay marcha ni inclinación de la cabeza.
0.5	La punta de la cola es floja. Cuando el ratón es recogido por la base de la cola, la cola tiene tensión excepto la punta. El esfuerzo muscular se siente en la cola, mientras que la cola continúa moviéndose.
1.0	Cola floja. Cuando el ratón es recogido por la base de la cola, en lugar de estar erecto, toda la cola cubre el dedo. Las patas traseras generalmente se separan. No se observan signos de movimiento de la cola.
1.5	Inhibición de cola floja y pata trasera. Cuando se levanta por la base de la cola, toda la cola cubre el dedo. Cuando el ratón se coloca en una rejilla de alambre, al menos una pata trasera cae a través constantemente. El caminar es un poco tambaleante.
2.0	Cola floja y debilidad de las patas traseras. Cuando se levanta por la base de la cola, las piernas no se separan, sino que se mantienen unidas. Cuando se observa que el ratón camina, tiene un andar tambaleante claramente evidente. Un pie puede arrastrar los dedos, pero la otra pierna no tiene inhibiciones aparentes del movimiento; O, El ratón parece tener una puntuación de 0.0, pero hay signos evidentes de inclinación de la cabeza cuando se observa la caminata. El balance es pobre.

2.5	Cola floja y arrastre de patas traseras. Ambas patas traseras tienen algo de movimiento, pero ambas se arrastran en los pies (el ratón se tropieza con las patas traseras). - O - Sin movimiento en una pierna / arrastrando completamente una pierna, pero con movimiento en la otra pierna. - O - La severidad de la EAE parece leve cuando se levanta (con una puntuación de 0.0-1.5), pero hay una fuerte inclinación de la cabeza que causa que el ratón caiga de vez en cuando.
3.0	Cola floja y parálisis completa de las patas traseras (las más frecuentes). - O - Cola floja y parálisis casi completa de las patas traseras. Una o ambas patas traseras son capaces de remar, pero ninguna pata trasera puede moverse hacia adelante de la cadera trasera. - O - Cola floja con parálisis de una pata delantera y otra trasera. - O - TODO: Cabeza inclinada severamente, caminando solo a lo largo de los bordes de la jaula, empujando contra la pared de la jaula, girando cuando se levanta por la base de la cola.
3.5	Cola floja y parálisis completa de patas traseras. Además de que: El ratón se está moviendo alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no puede enderezarse. Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo. - O - El ratón se mueve alrededor de la jaula, pero los cuartos traseros son planos como un panqueque, dando la apariencia de una joroba en los cuartos delanteros del ratón
4.0	Cola floja, parálisis completa y parcial de la pata trasera y delantera. El ratón se está moviendo mínimamente alrededor de la jaula, pero parece estar alerta y alimentándose. A menudo, se recomienda la eutanasia después de que el ratón obtenga una puntuación de 4.0 durante 2 días. Sin embargo, algunos ratones pueden recuperar a 3.5 o 3.0 con fluidos subcutáneos diarios. Cuando el ratón es sacrificado debido a una parálisis severa, se ingresa una puntuación de 5.0 para ese ratón durante el resto del experimento.
4.5	Parálisis completa posterior y parcial de la pata delantera, sin movimiento alrededor de la jaula. El ratón no está alerta. El ratón tiene un movimiento mínimo en las patas delanteras, apenas responde al contacto. Se recomienda la eutanasia. Cuando el ratón es sacrificado debido a una parálisis severa, se ingresa una puntuación de 5.0 para ese ratón durante el resto del experimento.
5.0	El ratón está rodando espontáneamente en la jaula.

Resultados:

La FIGURA 68 ilustra gráficamente los resultados del modelo EAE en ratones tratados con mAb 13B1 inhibidor de MASP-3 (10 mg/kg), mAb Factor B 1379 (40 mg/kg) o mAb de control de isotipo (10 mg/kg), en donde las flechas apuntando hacia abajo indican la dosis del anticuerpo anti-Factor B y las flechas apuntando hacia arriba indican la última dosis de mAb 13B1. Como se muestra en la FIGURA 68, los ratones tratados con mAb 13B1 inhibidor de MASP-3 y mAb 1379 del Factor B mostraron una mejoría en los síntomas clínicos calificados según los parámetros mostrados en la TABLA 35, en comparación con el control de isotipos.

De acuerdo con lo anterior, se espera que los anticuerpos inhibidores de MASP-3, tales como los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad descritos en el presente documento, sean beneficiosos (neuroprotectores o

neuroregenerativos) en el tratamiento y / o rehabilitación de un sujeto que padece esclerosis múltiple. Esclerosis concéntrica de Balo, neuromielitis óptica, esclerosis múltiple de Marburgo, enfermedad de Schilder, esclerosis múltiple tumefactiva y encefalomielitis diseminada aguda (ADM).

EJEMPLO 21

Estudio farmacodinámico con los mAb de MASP-3 representativos de alta afinidad en monos Cynomolgus.

Antecedentes/Justificación: Como se demostró en estudios con roedores (FIGURA 44), un anticuerpo inhibidor de la MASP-3 de alta afinidad fue capaz de inhibir la maduración pro-factor D en estado estable (en reposo) *in vivo*. Este ejemplo describe un estudio que se llevó a cabo en monos cynomolgus para determinar si los mAb inhibidores de MASP-3 de alta afinidad representativos son capaces de inhibir la actividad de APC en un primate no humano.

Métodos: Para confirmar que MASP-3 funciona en la APC en un primate no humano, y que los anticuerpos de MASP-3 de alta afinidad son capaces de inhibir la APC en un primate no humano, 9 monos cynomolgus (3 animales por condición de mAb) se les administró una sola dosis intravenosa de 5 mg/kg con uno de los tres anticuerpos inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad: h4D5X, h10D12X o h13B1X. ("h" se refiere a humanizado, "X" se refiere a la región bisagra constante de IgG4 (SEQ ID NO: 312) que contiene la sustitución de aminoácidos S228P estabilizadora y una mutación de la región constante de IgG4 humana con la mutación S228P y también una mutación que promueve las interacciones FcRn a bajo pH). Se recogieron muestras de plasma (EDTA) y suero a intervalos regulares durante un período de tres semanas o más.

Se emplearon dos ensayos para medir la actividad de APC en los sueros de monos tratados. El primer ensayo evaluó los niveles de factor de complemento Bb depositados en las perlas de zimosán añadidas al suero diluido. El segundo ensayo midió los productos de la fase fluida de la APC activada con zimosán, los factores del complemento Ba y Bb, así como la C3a.

La citometría de flujo utilizando el anticuerpo A252 (Quidel) del factor Bb se usó para detectar el factor Bb depositado en zimosán. Como medio para determinar la señal de fondo en el ensayo después de la inhibición completa de la APC, una alícuota de suero (5% final, diluido en GVB + Mg/EGTA) preparada a partir de monos cynomolgus tratados con mAb de MASP-3 se enriqueció con 300 nM de un anticuerpo inhibidor

del factor D. Para determinar el grado de inhibición de APC por el mAb de MASP-3 administrado por vía intravenosa al mono, se añadió otra alícuota de suero diluido con 300 nM de un anticuerpo de control de isotipo neutro (que no tiene actividad inhibidora de APC) antes de probar la deposición del factor Bb en el zimosán. Las mezclas de suero-anticuerpo enriquecido se incubaron durante 30 minutos en hielo antes de la adición de zimosán (0.1 mg/ml final). Las mezclas se incubaron a 37 ° C durante 65 minutos, y la actividad de APC se midió mediante la detección por citometría de flujo del factor de complemento Bb (anticuerpo A252 de Quidel) en la superficie de las partículas de zimosán.

Para determinar la generación de los marcadores de fase fluida Ba, Bb y C3a, se indujo la APC en ensayos *ex vivo* mediante la incubación de zimosán (1 mg/ml final) en suero (5% final, diluido en GVB + Mg/EGTA) preparado a partir de monos cynomolgus tratados con mAb anti-MASP-3. Las mezclas se incubaron a 37 ° C durante 40 minutos, y la actividad de APC se midió mediante la detección basada en ELISA de los puntos finales del complemento. Ba, Bb y C3a se detectaron en los sobrenadantes de la reacción utilizando kits de ELISA disponibles de forma comercial (Quidel). Los valores de absorbancia de todas las pruebas se normalizaron estableciendo los valores previos al tratamiento como 100% de actividad y una muestra de tratamiento previo incubada, pero no expuesta al zimosán, a 0%.

Con el fin de relacionar el grado de inhibición de APC con el anticuerpo con relación objetiva en monos tratados con mAb de MASP-3, se cuantificaron los niveles de mAb de MASP-3 en suero y de MASP-3 inhibidor. El suero MASP-3 se midió mediante un ensayo ELISA tipo sándwich. La proteína MASP-3 se capturó en una placa con αM3-259 (descrito en el Ejemplo 16). Las muestras de suero (diluidas 1:40) se incubaron primero con mAb de MASP-3 sin marcar (no biotinilado), correspondiente al mAb de tratamiento, a 37 ° C durante 1 hora, luego se diluyeron 1: 250 (final 1: 10,000) y se agregaron a la placa y se incubaron a 37 ° C durante otra hora. La placa se lavó y se usó una versión biotinilada de mAb 10D12 como un anticuerpo de detección. La gran dilución de suero previa a las etapas de detección se utilizó para desacoplar el mAb objetivo y el tratamiento, y para prevenir la competencia entre el anticuerpo de tratamiento y el anticuerpo de detección. Después de lavar la placa varias veces, se usó estreptavidina-HRP para la etapa de detección final. Los valores de absorbancia se recogieron a A450 con un lector de placas. Las concentraciones séricas de MASP-3 se extrapolaron de una curva estándar creada mediante el ensayo de la proteína MASP-3 recombinante de longitud completa. La cantidad de anticuerpo anti-MASP-3

presente en el suero se detectó usando el kit de ELISA IgG4 Terapéutico Humano (Cayman Chemicals), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El Análisis por Wester blot fue utilizado para analizar el nivel de Pro-Factor D y Factor D en suero de un mono cynomolgus a lo largo del tiempo (horas) después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de mAb h13B1X de 5 mg/kg. Descrito de forma breve, el análisis por Western blot se llevó a cabo mezclando 20 µl de plasma de cynomolgus obtenido en los diferentes puntos de tiempo antes del tratamiento (-120 h, -24 h) y después del tratamiento (72 h, 168 h, 336 h, 504 h, 672 h y 840 h) con PBS y 11.2 µL de anticuerpo anti-CFD (0.5 µg/µL) en un volumen total de 400 µL a 4 ° C durante 1 hora. Se agregaron 12 µl de proteína A/G Plus Agarosa (Santa Cruz Biotech) y la mezcla se incubó durante la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se recolectaron por centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos a 4ºC. Losgránulos se lavaron cinco veces con PBS. Después del lavado final, losgránulos se suspendieron nuevamente en 30 µl de tampón de desnaturalización de glicoproteína 1x y la glicoproteína se desnaturalizó calentando la reacción a 100ºC durante 10 minutos. Se añadió tampón de reacción 10X G2, NP-40 al 10% y 2.5 µL de péptido-N-glicosidasa (New England Biolabs, P0704L) en cada tubo y la reacción se incubó a 37 ° C durante 2 horas. Las perlas de agarosa se granularon por centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos y se recolectó 20 µl de sobrenadante en tubos nuevos. Las proteínas capturadas y desglicosiladas se resolvieron con SDS-PAGE (NuPAGE 12% Bis-Tris Mini Gel) y los geles se sometieron a electrotransferencia para el análisis por Western blot con un anti-CFD biotinilado (R&D Systems BAF1824) y Pierce ™ High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fischer Scientific 21130).

Resultados:

La FIGURA 69 ilustra gráficamente la actividad de APC en muestras de suero obtenidas de un grupo de tres monos cynomolgus a lo largo del tiempo después de un tratamiento único en el tiempo = 0 con mAb de MASP-3 de alta afinidad h13B1X. La figura muestra el MFI promedio en un ensayo por citometría de flujo que detecta el factor de complemento Bb en la superficie de las partículas de zimosán en un 5% de suero enriquecido con el mAb D de inhibición de APC o el mAb de control de isotipo neutro. Como se muestra en la FIGURA 69, los animales muestran una actividad de APC disminuida tan pronto como 4 horas. Si el tratamiento con el anticuerpo MASP-3 bloquea la APC de manera tan efectiva como la inhibición del Factor D, las dos condiciones del anticuerpo enriquecido demostrarán niveles idénticos de inhibición de la deposición de Bb en muestras posteriores a la dosis, pero no en la pre-dosis (o tiempo = 0; FIGURA 69) condición. Como se muestra en la FIGURA 69, 72 horas

después del tratamiento, la actividad de APC disminuye hasta aproximadamente la alcanzada agregando el mAb del Factor D a las muestras de suero. La inhibición casi completa debido al tratamiento con h13B1X, según lo determinado experimentalmente por comparación con el anticuerpo del Factor D enriquecido, persiste hasta 336 horas (14 días) después de la dosis. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con un mAb inhibidor de MASP-3 de alta afinidad proporciona una inhibición completa y sostenida de la APC en un primate no humano.

La FIGURA 70 ilustra gráficamente la actividad de APC, determinada por la deposición de Bb en zimosán, en muestras de suero obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) tratados con una sola dosis intravenosa de 5 mg/kg de mAbs h4D5X, h10D12X o h13B1X inhibidores de MASP-3 de alta afinidad. Se recolectaron los datos de deposición de Bb como se describe anteriormente. La actividad de APC para los puntos de tiempo del tratamiento se normalizó, estableciendo las MIF de tratamiento previo de muestras enriquecidas con el anticuerpo de control de isotipo no inhibidor, como actividad del 100%, y una muestra de tratamiento previo incubada con EDTA 50 mM (para inhibir toda la actividad del complemento) para 0%. Los datos del tratamiento con h13BX utilizados para la FIGURA 70 también se reflejan en la FIGURA 69. Como se muestra en la FIGURA 70, el tratamiento con los tres anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad dio como resultado una inhibición mayor de 95% de la APC. Los animales tratados con h4D5X, h10D12X y h13B1X mantuvieron al menos un 90% de inhibición de la APC durante 6.7, 11.7 y 16 días, respectivamente. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con estos mAbs inhibidores de MASP-3 representativos de alta afinidad proporciona una inhibición sostenida de la APC en un primate no humano con una dosis única de 5 mg/kg.

La FIGURA 71A-C ilustra gráficamente medidas adicionales de la actividad de APC. Ba de fase fluida (FIGURA 71A), Bb (FIGURA 71B) y C3a (FIGURA 71C) se midieron en muestras de suero diluidas tratadas con zimosán obtenidas de grupos de monos cynomolgus (3 animales por grupo) a lo largo del tiempo después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de 5 mg/kg de h4D5X, h10D12X y h13B1X como se describió anteriormente.

Como se muestra en la FIGURA 71A-C, las administraciones únicas de los tres anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad dieron como resultado la inhibición de la APC, según lo definido por tres puntos finales de fase líquido diferentes. Estos datos son consistentes con el nivel de inhibición de APC demostrado en el estudio de deposición de Bb de la FIGURA 70, e ilustran adicionalmente la

eficacia de estos mAb para inhibir la vía durante varias semanas.

La FIGURA 72A-C ilustra gráficamente la relación de la actividad de APC, determinada por la producción de Ba en fase líquida, con respecto a la relación molar de MASP-3 monomérico y anticuerpo mAb de MASP-3 detectado en suero de monos tratados con h4D5X (FIGURA 72A) , h10D12X (FIGURA 72B) o h13B1X (FIGURA 72C). Cada panel en la FIGURA 72A-C representa los datos de un mono. Los sujetos primates utilizados y el suero (o plasma) obtenido en este estudio son los mismos que los descritos anteriormente (FIGURAS 69, 70 y 71).

Las FIGURAS 72A-C ilustran gráficamente la relación molar del objetivo (MASP-3) a los anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad h4D5X (FIGURA 72A), h10D12X (FIGURA 72B) y h13B1X (FIGURA 72C) en los momentos de la inhibición completa de APC medido por la fase líquida Ba. Para propósitos de referencia, la relación molar del objetivo 1: 1 a anticuerpo se muestra como una línea de puntos en cada gráfica. Como se muestra en las FIGURAS 72A-C, el objetivo (MASP-3) frente a los mAb inhibidores de MASP-3 de alta afinidad h4D5X, h10D12X y h13B1X en una relación molar en el rango de aproximadamente 2: 1 a aproximadamente 2.5: 1 (objetivo del anticuerpo) son suficientes para inhibir completamente la APC. Estos datos demuestran que estos tres mAb inhibidores de MASP-3 representativos son potentes anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que son capaces de inhibir la APC cuando están presentes en concentraciones molares menores que la concentración del objetivo. Estos niveles de potencia indican claramente que los mAb tienen el potencial de ser utilizados clínicamente para tratar enfermedades o indicaciones causadas por la APC.

La FIGURA 73 muestra un análisis por Western blot que analiza el nivel de pro-Factor D y Factor D en suero de un mono cynomolgus a lo largo del tiempo (horas) antes y después del tratamiento con una sola dosis intravenosa de 5 mg/kg de mAb h13B1X. Como se muestra en la FIGURA 73, el Factor D está presente en el plasma como pro-Factor D durante al menos 336 horas (14 días) después de una dosis única de mAb h13B1X.

Resumen de los resultados

Como se describe en el Ejemplo 11, una administración de dosis única de un anticuerpo inhibidor de MASP-3 de alta afinidad, mAb 13B1, a ratones condujo a una ablación casi completa de la actividad del complemento de la vía alternativa sistémica durante al menos 14 días. Como se describe más detalladamente en el ejemplo 12,

en un estudio realizado en un modelo animal bien establecido asociado con la PNH, se demostró que el mAb 13B1 mejoró significativamente la supervivencia de los glóbulos rojos similares a la PNH y que los glóbulos rojos similares a la PNH protegieron significativamente mejor que la inhibición de C5. Como se describe en el ejemplo 13, se demostró además que el mAb 13B1 redujo la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de artritis. Los resultados en este ejemplo demuestran que los mAbs 13B1, 10D12 y 4D5 inhibidores de MASP-3 de alta afinidad son altamente efectivos para bloquear la vía alternativa en primates. La administración de dosis única de mAb 13B1, 10D12 o 4D5 a monos cynomolgus dió como resultado una ablación sostenida de la actividad de la vía sistémica alternativa que duró aproximadamente 16 días. El grado de ablación de la vía alternativa en monos cynomolgus tratados con anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad fue comparable al alcanzado por el bloqueo del factor D *in vitro*, lo que indica un bloqueo completo de la conversión del factor D por los anticuerpos inhibidores de MASP-3. Por lo tanto, los mAb inhibidores de MASP-3 de alta afinidad tienen utilidad terapéutica en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades relacionadas con la hiperactividad de las vías alternativas, como, por ejemplo, la hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, incluida la AMD húmeda y seca), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aUSH), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) o TMA asociado a trasplante), asma, enfermedad de depósitos densos, neuromielitis optica, enfermedad cerebral de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ELA), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (LES), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra injerto (GVHD), hemodiosis , sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), vasculitis ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia grave.

VII. OTRAS REALIZACIONES

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos, composiciones y compuestos descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito

en relación con realizaciones específicas deseadas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en los campos de la medicina, inmunología, farmacología, oncología o campos relacionados estén dentro del alcance de la invención.

De acuerdo con lo anterior, la invención presenta las siguientes realizaciones.

Anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP

1A. Un anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígenos que se une específicamente al dominio de la serina proteasa del MASP-3 humano (residuos de aminoácidos 450 a 728 del SEQ ID NO:2) con alta afinidad (con un K_D inferior a 500 pM), donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos inhibe la activación del complemento de la vía alternativa.

2A. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se caracteriza por al menos una o más de las siguientes propiedades:

(a) inhibe la maduración del factor D;

(b) no se une al MASP-1 humano (SEQ ID NO:8);

(c) inhibe la vía alternativa en una proporción molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2.5:1 (objetivo MASP-3 a mAb) en un sujeto mamífero;

(d) no inhibe la vía clásica.

(e) inhibe la hemólisis y/o opsonización;

(f) inhibe la escisión específica del sustrato de proteasa serina MASP-3;

(g) una reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y de la deposición de la superficie C3b;

(h) una reducción de la deposición del factor B y del factor Bb en una superficie activada;

(i) una reducción de los niveles de reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie activadora) del Factor D activo en relación con el pro-Factor D;

(j) una reducción de los niveles de Factor D activo en relación con el pro-Factor D en respuesta a una superficie activadora;

(k) una reducción de la producción de los niveles en reposo y / o inducidos por la superficie de las fases líquidas Ba, Bb, C3b o C3a y / o

(l) una reducción de la deposición del factor P.

3A. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del mismo que figura en los párrafos 1 o 2, en los que dicho anticuerpo el fragmento de unión a antígenos se une específicamente a un epítopo situado dentro del dominio de la proteasa serina del MASP-3 humano, en el que dicho epítopo se encuentra en al menos uno o varios de ellos: VLRSQRRDTTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO:11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO:12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO:13), VSNYVDWVWWE (SEQ ID NO:14) y/o VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:15). [Grupo I]

4A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 3, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:15. [Incluye todos los abs del grupo I]

5A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 3, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:9. [10D12]

6A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 3, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:10. [13B1]

7A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 6, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:12. [13B1]

8A. El de anticuerpo el fragmento de unión a antígenos del párrafo 3, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de SEQ ID NO:10 y/o SEQ ID NO:12. [13B1]

9A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 3, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:9. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

10A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 7, donde el

anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de al menos uno de los códigos SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 y/o SEQ ID NO:14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

11A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 7, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de al menos uno de los códigos SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y/o SEQ ID NO:14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

12A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1 o 2, donde el anticuerpo se une a un epítopo dentro de al menos uno de ellos: ECGQPSRSLPSLPSLV (SEQ ID NO:16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO:17); KWFGSGALLSASWIL(SEQ ID NO:18); EHVTVYLGLGLH (SEQ ID NO:19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO:20); APHMLGL (SEQ ID NO:21); SDVLQYVYVKLP (SEQ ID NO:22); y / o AFVVIFDDLSQRWRW [grupo II y III]

13A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 12, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:17. [Todos los grupos II y III abs]

14A. El anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del párrafo 13, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19) y/o AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23). [1G4, 1E7, 2D7 15D9]

15A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 14, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro del SEQ ID NO:23. [1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5]

16A. El anticuerpo o fragmento de unión antígenos del párrafo 14, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de SEQ ID NO:19 y/o SEQ ID NO:23. [Ig4, 1E7, 2D7]

17A. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del párrafo 14, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno también se une a un epítopo dentro de SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:23. [15D9, 2F5]

18A. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del párrafo 14, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de al menos uno de los SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y/o SEQ ID NO:23[15D9, 2F5].

19A. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del párrafo 14, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de al menos uno de los códigos SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 21 y/o SEQ ID NO:22. [1B11]

20A. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del párrafo 14, donde el anticuerpo el fragmento de unión a antígenos también se une a un epítopo dentro de al menos uno de los códigos SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 21 y/o SEQ ID NO:22[1B11].

21A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 20, en los que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos se selecciona del grupo formado por un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores.

22A. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del mismo de cualquiera de los párrafos 1 a 21, en los que dicho anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos del mismo se selecciona del grupo formado por un anticuerpo de cadena única, un ScFv, un fragmento de Fab, un fragmento de Fab', un fragmento de F(ab')2, un anticuerpo univalente sin región de bisagra y un anticuerpo completo.

23A. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 22, que comprende además una región constante de inmunoglobulina.

24A. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 23, en los que se humaniza el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

25A. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 24 en los que dicho anticuerpo se une al dominio de la serina proteasa del MASP-3 humano con una afinidad inferior a 500 pM.

26A. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1 a 25, en los que dicho anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en sangre de mamífero.

27A. Una composición que comprenda el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1A a 26A y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

A. Anticuerpos inhibidores IA de MASP-3 del grupo de alta

afinidad que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP (4D5, 4B6, 1A10 más variantes 4D5)

1B. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al MASP-3 y que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:209 (XXDIN, donde X en la posición 1 es S o T y donde X en la posición 2 es N o D); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, donde X en la posición 7 es G o D; X en la posición 8 es S, T o R; X en la posición 9 es I o T; X en la posición 13 es E o D; X en la posición 14 es K o E; y X en la posición 16 es T o K); y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:211 (XEDXY, donde X en la posición 1 es L o V, y donde X en la posición 4 es T o S); y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprenda un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, en la que X en la posición 8 es N, I, Q o A; en la que X en la posición 9 es S o T; y en la que X en la posición 17 es A o S); un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:144 (WASTRES) y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:146 (KQSYNLYT).

2B. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra (a) comprende el SEQ ID NO:56 (TDDIN). [4D5 y variantes]

3B. 2. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra (a) comprende el SEQ ID NO:62 (SNDIN). [1F3, 4B6 y 1A10]

4B. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR2 de la región de la cadena variable pesada según la letra (a) comprende el SEQ ID NO:58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD) [4D5 y variantes].

5B. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR2 de la región de la variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra (a) comprende el SEQ ID NO:63 (WIYPRDGGSIKYNEKFTD). [1F3]

6B. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR2 de la región de la variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra

(a) comprende el SEQ ID NO:67 (WIYPRDGTTTKYNEEFTD). [4B6]

7B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el HC-CDR2 de la región de la variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra (a) comprende el SEQ ID NO:69 (WIYPRDGTTTTKYNEKFTD). [1A10]

8B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada según la letra (a) comprende el SEQ ID NO:60 (LEDTY)[4D5 y sus variantes].

9B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada según la letra (a) comprende el SEQ ID NO:65 (VEDSY). [1F3, 4B6 y 1A10]

10B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera según la letra (b) comprende el SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); el SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA), el SEQ ID NO:258 (KSSQSLLSLLASRTRKNYLA); o el SEQ ID NO:259 (KSSQSLLLNTRTRKNYLA). [4D5 y variantes]

11B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 10, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera según la letra (b) comprende el SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA). [4D5 NA mutante]

12B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera según la letra (b) comprende el SEQ ID NO:149 (KSSQSLLISRTRKNYLS). [1F3 y 4B6]

13B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el HC-CDR1 comprende el SEQ ID NO:56, el HC-CDR2 incluye el SEQ ID NO:58, el HC-CDR3 incluye el SEQ ID NO:60 y el LC-CDR1 incluye el SEQ ID NO:142, el SEQ ID NO:257, el SEQ ID NO:258 o el SEQ ID NO:259; en el que el LC-CDR2 incluye el SEQ ID NO:144 y el LC-CDR3 incluye el SEQ ID NO:146 los 6 CDR de 4D5 con variantes en LC-CDR1].

14B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que el HC-CDR1 incluye el SEQ ID NO:62, el HC-CDR2 incluye el SEQ ID NO:63, el SEQ ID NO:67 o el SEQ ID NO:69, el HC-CDR3 incluye el SEQ ID NO:65 y en el que el LC-CDR1 incluye el SEQ ID NO:149, el LC-CDR2 incluye el SEQ ID NO:144 y el LC-CDR3 incluye el SEQ ID NO:146 todos los 6 CDRS de 1F3, 4B6 y 1A10]

15B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 14, en los que el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos se selecciona del grupo formado por un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores.

16B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 15, en los que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígenos se selecciona del grupo formado por un anticuerpo de la cadena única, un ScFv, un fragmento de Fab, un fragmento de Fab', un fragmento de F(ab')2, un anticuerpo univalente sin región de bisagra y un anticuerpo completo.

17B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 16, que comprende además una región constante de inmunoglobulina.

18B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 17, en el que se humaniza el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos.

19B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% idéntica al SEQ ID NO:24, el SEQ ID NO:248 o el SEQ ID NO:249 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100% idéntica al SEQ ID NO:40, el SEQ ID NO:250 o el SEQ ID NO:278[4D5 versiones parentales, humanizadas y modificadas].

20B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, donde el anticuerpo o unión a antígenos comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:25 y una cadena ligera que comprende al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:41[1F3].

21B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:26 y una cadena ligera que comprende al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:42[4B6].

22B. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO:27 y una cadena ligera que comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a SEQ ID NO:42[1A10].

23B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 22 en el que dicho anticuerpo se une al MASP-3 humano con una afinidad inferior a 500 pM.

24B. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1 a 23, en el que dicho anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en sangre de mamífero.

25B. Una composición que comprenda el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1B-24B y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

B. Anticuerpos inhibidores de MASP-3 del grupo IB de alta afinidad que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP (variantes 10D12, 35C1 y 10D12)

1C. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al MASP-3 y que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende un HC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:213 (SYGXX, en el que X en la posición 4 es M o I y en el que X en la posición 5 es S o T); un HC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:74; y un HC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:214 (GGXAXDY, en el que X en la posición 3 es E o D y X en la posición 5 es M o L); y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende un LC-CDR1 establecido como SEQ ID NO:215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, en la que X en la posición 10 es D, E o A; en la que X en la posición 11 es G o A; y en la que X en la posición 16 es N o S); un LC-CDR2 establecido como SEQ ID NO:155; y un LC-CDR3 establecido como SEQ ID NO:216 (WQGTHFPXT, en la que X en la posición 8 es W o Y).

2C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígenos del párrafo 1, en el que

el HC-CDR1 de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con la letra a) comprende el SEQ ID NO:72 (SYGMS). [10D12 y variantes]

3C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR1 de la región de la variable de la cadena pesada según la letra a) comprende el SEQ ID NO:79 (SYGIT). [35C1]

4C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada según la letra a) comprende el SEQ ID NO:76 (GGEAMDY). [10D12 y variantes].

5C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el HC-CDR3 de la región variable de la cadena pesada según la letra a) comprende el SEQ ID NO:82 (GGDALDY). [35C1]

6C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera según la letra b) comprende el SEQ ID NO:153 (KSSQSLLDSDGKTYLN); el SEQ ID NO:261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), el SEQ ID NO:262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) o el SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). [10D12 y variantes]

7C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende el SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). [Variante 10D12 GA]

8C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el LC-CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende el SEQ ID NO:152. [35C1]

9C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el LC-CDR3 de la región variable de la cadena ligera según (b) comprende el SEQ ID NO:159 (KSSQSLLDSDGKTYLS). [10D12]

10C. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en el que el LC-CDR3 de la región variable de la cadena ligera según (b) comprende el SEQ ID NO:160 (WQGTHFPYT). [35C1]

11C. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el

HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 72, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 74, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 76, la LC CDR1 comprende la SEQ ID NO: 153, la SEQ ID NO: 261, la SEQ ID NO: 262 o la SEQ ID NO: 263; la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 155 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 157. [Todas las 6 CDR de 10D12 con variantes en LC-CDR1]

12C. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, en que la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 79, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 74, la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 82, la LC CDR1 comprende la SEQ ID NO: 159, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 155 y la LC-CDR3 comprende la SEC ID NO: 160. [Todas las 6 CDRs de 35C1]

13C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-12, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores.

14C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-13, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de la cadena única, un ScFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un Fragmento F (ab') 2, un anticuerpo univalente que carece de una región bisagra y un anticuerpo completo.

15C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos 1-14, que además comprende una región constante de inmunoglobulina.

16C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos 1-15, donde se humaniza el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

17C. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos comprend una cadena pesada que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 251 o la SEQ ID NO: 252 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO : 43, SEQ ID NO: 253 o SEQ ID NO: 279 [10D12 parental, humanizado y variantes].

18C. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el

anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico al SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 44 [35C1].

19C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-18 donde el anticuerpo se une a MASP-3 humano con una afinidad de menos de 500 pM.

20C. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-19, donde el anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en la sangre de mamíferos.

21C. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1C-20C y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

C. Anticuerpos inhibidores de MASP-3 del grupo IC de alta afinidad que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP (13B1 y variantes)

1D. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a MASP-3 y comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 84 (GKWIE); una HC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) o SEQ ID NO: 275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 88 (SEDV); y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO: 257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO: 258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); o SEQ ID NO: 259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 144 (DESPERDICIOS); y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 161 (KQSYNIPT). [Todas las 6 CDR de 13B1 y variantes en LC-CDR1]

2D. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 258. [Variante 13B1 LC-CDR1 NA]

3D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-

2, en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores.

4D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-3, en que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de la cadena única, un ScFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab ', un Fragmento F (ab ') 2, un anticuerpo univalente que carece de una región bisagra y un anticuerpo completo.

5D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-4, que además comprende una región constante de inmunoglobulina.

6D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-5, en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está humanizado.

7D. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo consta de una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 254 o SEQ ID NO: 255 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 256 o SEQ ID NO: 280 [13B1 parental, humanizado y variantes].

8D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-7 donde el anticuerpo se une a MASP-3 humano con una afinidad de menos de 500 pM.

9D. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-8 donde el anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en la sangre de mamífero.

10D. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1D-9D y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

D. Anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad del grupo II que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP (1G4)

1E. Un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a

MASP-3 y comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 91 (GYWIE); una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), y una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 95 (SIDY); y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 165 (KVSNRFS) y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 167 (SQSTHVPPT).

2E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de lo anterior.

3E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-2, en que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de la cadena única, un ScFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab ', un Fragmento F (ab ') 2, un anticuerpo univalente que carece de una región bisagra y un anticuerpo completo.

4E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de los párrafos 1-3, que además comprende una región constante de inmunoglobulina.

5E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de los párrafos 1-4, en que el se humaniza el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

6E. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 31 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 46 [1G4].

7E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-6 en que dicho anticuerpo se une a MASP-3 humano con una afinidad menos de 500 pM.

8E. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-7,

en que dicho anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en la sangre de mamíferos.

9E. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1E-8E y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

F. Anticuerpos inhibidores de MASP-3 de alta afinidad del grupo III que se unen a uno o más epítopos dentro del dominio SP (1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11, 2F2, 11B6)

1F. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a MASP-3 que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 109 (RVHFAIRDTNYWMQ), una HC-CDR2 establecida como la SEQ ID NO: 110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), una HC-CDR3 como la SEQ ID NO: 112 (GSHYFDY); y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 182 (RASQSIGTSIH), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 184 (YASESIS) y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 186 (QQSNSWPYT) [1E7]; o

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 125 (DYYMN), una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 129 (CPFYYLGKGTHFDY); y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 196 (RASQDISNFLN), una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 198 (YTSRLHS) y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 200 (QQGFTLPWT) [2D7]; o

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 132, una HC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 133, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 135; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 203, una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 165 y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 204 [49C11]; o

(d) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1

establecida como SEQ ID NO: 137 una HC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 138, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 140; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 206, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 207 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 208 [15D9];

(e) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 98, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 99, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 101; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 169, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 171 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 173. [2F5]; o

(f) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 como SEQ ID NO: 103, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 105, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 107; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 176, una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 193 [1B11]; o

(g) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 114, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 116, una HC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 118; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 188, una LC-CDR2 establecida como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 establecida como SEQ ID NO: 190 [2F2]; o

(h) una región variable de la cadena pesada que comprende una HC-CDR1 establecida como SEQ ID NO: 114, una HC-CDR2 como SEQ ID NO: 121, una HC-CDR3 como SEQ ID NO: 123; y una región variable de la cadena ligera que comprende una LC-CDR1 como SEQ ID NO: 191, una LC-CDR2 como SEQ ID NO: 178 y una LC-CDR3 como SEQ ID NO: 193. [11B6]

2F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1 (a) - (g), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo murino y un fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los anteriores.

3F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-2, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del

grupo que consiste en un anticuerpo de la cadena única, un ScFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab ', un Fragmento F (ab ') 2, un anticuerpo univalente que carece de una región bisagra y un anticuerpo completo.

4F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-3, que además comprende una región constante de inmunoglobulina.

5F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los párrafos 1-4, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está humanizado.

6F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ. ID NO: 32 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 47 [1E7].

7F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que consta al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 33 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 48 [2D7].

8F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ. ID NO: 34 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 49 [49C11].

9F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo consta una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 35 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 50 [15D9]

10F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo consta una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 51 [2F5].

11F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo consta de una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 37 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 52 [1B11].

12F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo consta de una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 38 y una cadena ligera que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO: 53 [2F2].

13F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del párrafo 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo consta de una cadena pesada que comprende al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico al SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que comprende al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica al SEQ ID NO: 54 [11B6].

14F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos 1-13 en que que dicho anticuerpo se une a MASP-3 humano con una afinidad de menos de 500 pM.

15F. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de los párrafos 1-14, en que dicho anticuerpo inhibe la activación de la vía alternativa en la sangre de mamíferos.

16F. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígenos de cualquiera de los párrafos 1F-15F y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

E. Uso de anticuerpos inhibidores de MASP-3 para el tratamiento de enfermedades de AP

1. Un método para inhibir la activación del complemento de la vía alternativa en un mamífero, el método que comprende administrar a un sujeto mamífero que lo necesite una cantidad de una composición que comprende un anticuerpo inhibidor de

la MASP-3 de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno del mismo suficiente para inhibir la vía alternativa Activación de la vía del complemento en el mamífero.

2. El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a MASP-3 con una afinidad de menos de 500 pM.

3. El método del párrafo 1, en el que, como resultado de administrar la composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno, uno o más de los siguientes están presentes en el sujeto mamífero:

(a) inhibición de la maduración del Factor D;

(b) inhibición de la vía alternativa cuando se administra al sujeto en una relación molar de aproximadamente 1: 1 a aproximadamente 2.5: 1 (mAb objetivo a MASP-3)

(c) La vía clásica no está inhibida.

(d) inhibición de la hemólisis y / u opsonización;

(e) una reducción de la hemólisis o la reducción de la escisión de C3 y la deposición superficial de C3b;

(f) una reducción de la deposición de Factor B y Bb en una superficie de activación;

(g) una reducción de los niveles de reposo (en circulación y sin la adición experimental de una superficie de activación) del Factor D activo en relación con el Factor D pro;

(h) una reducción de los niveles del factor D activo en relación con el pro-factor D en respuesta a una superficie activadora; y/o

(i) una reducción de la producción de niveles en reposo e inducidos en la superficie de Ba, Bb, C3b o C3a en fase líquida.

4. El método del párrafo 1, donde el anticuerpo inhibe la vía alternativa en una relación molar de aproximadamente 1: 1 a 2.5: 1 (objetivo MASP-3 a mAb)

5. El método de cualquiera de los párrafos 1-3 donde el anticuerpo de MASP-3 de alta afinidad se caracteriza de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27A, 25B, 21C, 10D, 9E o 16F.

6. El método de cualquiera de los párrafos 1-4, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe selectivamente la vía alternativa sin afectar la activación de la vía clásica.

7. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que el sujeto mamífero padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno de una vía alternativa seleccionado del grupo que consiste en hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), degeneración macular relacionada con la edad (AMD, incluida la AMD húmeda y seca), lesión por isquemia-reperfusión, artritis, coagulación intravascular diseminada, microangiopatía trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico (SHU), síndrome urémico hemolítico atípico (HUSa), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) o TMA asociada al trasplante), asma, enfermedad de depósitos densos, glomerulonefritis crescentic necrotizante inmune necrotizante, lesión cerebral traumática, neumonía por aspiración, endoftalmitis, neuromielitis óptica, enfermedad de Behcet, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amilotrófica (ALS), nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico (SLE), retinopatía diabética, uveítis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), glomerulopatía C3, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra injerto (GVHD), hemodiosis , sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis ANCA, síndrome antifosfolípido, aterosclerosis, nefropatía por IgA y miastenia grave.

Aunque la realización preferida de la invención se ha ilustrado y descrito, se apreciará que pueden realizarse diversos cambios en ella sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.