

ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS QUE SE UNEN AL DOMINIO SERINA-PROTEASA DE MASP-2 Y USOS DE ESTOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al dominio serina proteasa de MASP-2 y a las composiciones y métodos relacionados.

DECLARACIÓN EN RELACIÓN CON EL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias asociado con esta solicitud se proporciona en formato XML en lugar de una copia impresa, y se incorpora en virtud de la presente como referencia en la memoria. El nombre del archivo XML que contiene el listado de secuencias es MP10329US.XML; el archivo XML tiene 88 KB, fue creado el 18 de noviembre de 2022 y se lo envía a través de Patent Center con la presentación de la memoria.

ANTECEDENTES

El sistema del complemento propicia la defensa innata del hospedador contra patógenos y otras agresiones agudas (M. K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York), y también desempeña un papel en la vigilancia inmunitaria contra el cáncer (P. Macor, *et al.*, *Front. Immunol.*, 9:2203, 2018). Más de 30 proteínas en fase-fluido y unidas a membranas están involucradas en el sistema del complemento (S. Meyer, *et al.*, *mAbs*, 6:1133, 2014). La mayor parte de ellas son proteínas reguladoras, las que coordinan una cascada sumamente regulada de eventos de activación. El sistema del complemento responde rápidamente a las señales de agresión molecular a través de una cascada de reacciones proteolíticas secuenciales iniciadas por la unión de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) a estructuras características en células dañadas, superficies biomateriales o intrusos microbianos (Reis *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 18:5, 2018). La activación de la cascada del sistema de complemento induce diversas

funciones efectoras inmunitarias, tales como citólisis, fagocitosis, quimiotaxia y activación inmunitaria (S. Meyer, *et al.*, 2014). Asimismo, el sistema del complemento también actúa como puente entre la respuesta inmunitaria innata y la activación posterior de la inmunidad adaptativa. Además de sus propiedades antiinfecciosas, el sistema del complemento también está involucrado en la depuración de inmunocomplejos y células apoptóticas, en la regeneración hística, en la movilización de hemocitoblastos y en la angiogénesis (T. M. Pierpont *et al.*, Front. Oncol., 8:163, 2018).

El sistema del complemento puede activarse a través de tres vías distintas: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de la lectina. Véase la FIGURA 1.

La vía clásica (CP) es iniciada principalmente por complejos anticuerpo-antígeno. Los anticuerpos de las subclases IgM e IgG se unen a un antígeno sobre la superficie de un patógeno o de una célula efectora y reclutan al complejo C1, que está compuesto por el subcomponente de reconocimiento multimolecular C1q (compuesto por seis heterotrímeros de la cadena C1q A, la cadena B y la cadena C) y las serina proteasas asociadas a C1q, es decir, C1r y C1s. Tras la unión de C1q a la región Fc de una IgM unida a un antígeno o bien de al menos dos anticuerpos IgG unidos a sus antígenos, la serina proteasa C1r se activa automáticamente a su forma enzimáticamente activa y luego escinde y activa a su sustrato, C1s. Una vez activado, C1s escinde a C4 en sus fragmentos C4a y C4b. C2 se une a C4b y genera el complejo C4bC2. En un segundo paso de escisión, C1s escinde a C2 dentro del complejo C4bC2 y libera C2b para formar el complemento C3 que convierte el complejo enzimático C4bC2a, una supuesta C3·convertasa, el que escinde el componente C3 del complemento abundante en el plasma en C3a y C3b.

La vía de la lectina es desencadenada por la unión de moléculas de reconocimiento de patrones, tales como la lectina de unión a la manosa (MBL),

las ficolinas o la colectina-11 y la colectina-10, a los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) o a las células hospedadoras alteradas o apoptóticas. Las moléculas de reconocimiento forman un complejo con las serina proteasas asociadas a MBL, MASP-1 y MASP-2, y las activa tras unirse a sus ligandos análogos. La MASP-2 activada escinde C4 y C2 unida a C4b para formar la C3·convertasa (C4bC2a).

La vía alternativa es iniciada por la hidrólisis espontánea de C3 (“activación basal”) a C3(H₂O), la que se une al factor B (fB). La conversión de los complejos C3(H₂O)fB resultantes en C3·convertasa enzimáticamente activa requiere la actividad enzimática de otra serina proteasa altamente específica, llamada factor de complemento D. Se cree que la disponibilidad del factor D enzimáticamente activo es un factor limitante para el asa de amplificación de la vía alternativa y la disponibilidad de factor D requiere la acción de otra enzima, MASP-3, necesaria para la conversión del profactor D (proCFD) en su forma activa, el factor D maduro (matCFD, o simplemente CFD) (Dobó *et al.*, 2016). CFD activa el fB unido a C3(H₂O) en Ba y Bb. Bb también es una serina proteasa y participa en la formación de la C3·convertasa C3(H₂O)Bb de la vía alternativa, la que escinde a C3 en C3a y C3b. A través de este mecanismo, la vía alternativa resulta constitutivamente activa en bajas concentraciones. El asa de amplificación AP se forma cuando la C3b recién generada, formada por C3(H₂O)Bb o bien por la lectina y la C3·convertasa de la vía clásica, C4bC2a, se une a las superficies efectoras, tales como las células bacterianas, y fija fB para formar complejos C3bfB que, tras ser escindidos por CFD, crean el complejo de C3·convertasa de la vía alternativa, C3bBb. Esta convertasa puede ser estabilizada aún más por la properdina, la que impide la degradación del complejo y la conversión de C3b a cargo del factor I y sus cofactores.

Las tres vías convergen en la etapa de activación de C3. El fragmento C3a de la escisión de C3 es una anafilotoxina que promueve la inflamación. C3b

funciona como una opsonina por unión covalente a través de su enlace tioéster sobre la superficie de las células efectoras, con lo cual las marca para las células efectoras en circulación que expresan el receptor del complemento (CR), tales como células citolíticas naturales (NK) y macrófagos, las que contribuyen con la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC) y la fagocitosis celular dependiente del complemento (CDCP), respectivamente. C3b también se une a la C3-convertasa (ya sea C4bC2a o C3bBb) para formar una C5-convertasa (C4bC2a[C3b]_n o C3bBb[C3b]_n, respectivamente), lo que da lugar a la formación de MAC y, posteriormente, a CDC. Además, los fragmentos de degradación de C3b unidos a la célula, iC3b y C3dg, pueden promover la citotoxicidad mediada por el receptor del complemento (CDCC y CDCP) junto con la respuesta inmunitaria adaptativa a través de la activación de las células B (M. C. Carroll, Nat. Immunol., 5:981, 2004).

La formación de C5-convertasa da lugar a la escisión de C5 en C5a y C5b. C5a es otra anafilotoxina. C5b recluta C6-9 para formar el complejo de ataque a la membrana (MAC, o complejo C5b-9). El complejo MAC provoca la formación de poros, lo que aparece la destrucción de la membrana de la célula efectora y la citólisis (también llamada citotoxicidad dependiente del complemento, CDC). La citólisis directa a través de la formación de MAC ha sido reconocida tradicionalmente como un mecanismo efector terminal del sistema del complemento. Sin embargo, se cree que la opsonización mediada por C3b y la transducción de señales proinflamatorias, además de la función anafilotoxina de C3a, desempeñan un papel significativo en la mediación de la patología inflamatoria dependiente del complemento.

Si bien la activación del complemento proporciona una valiosa primera línea de defensa contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inmunitaria protectora también pueden representar una amenaza potencial al hospedador (K. R. Kalli, *et al.*, Springer Semin.

Immunopathol. 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos de C3 y C5 reclutan y activan neutrófilos. Si bien son indispensables para la defensa del hospedador, los neutrófilos activados no discriminan en su liberación de enzimas destructivas y pueden provocar daño orgánico. Además, la activación del complemento puede provocar la precipitación de componentes lípidos del complemento sobre las células hospedadoras aledañas y los objetivos microbianos, lo cual da lugar a la citólisis de las células hospedadoras.

El sistema del complemento ha estado involucrado en la patogénesis de numerosos cuadros clínicos agudos y crónicos, incluidos: infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), complicaciones asociadas con la diabetes, lesión isquémica por reperfusión, trastornos gastrointestinales inflamatorios, choque séptico, extravasación capilar como resultado de quemaduras por calor, enfermedad injerto contra huésped, trastornos oftálmicos, inflamación posterior a una derivación cardiopulmonar, rechazo al trasplante, microangiopatía trombótica (TMA), afecciones renales, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave y enfermedad de Alzheimer. La activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante en estas y otras enfermedades y representa un punto eficaz para el control clínico en muchos de estos cuadros clínicos. El reconocimiento cada vez mayor de la importancia de las lesiones tisulares mediadas por el complemento en uno o más de una serie de cuadros clínicos subraya la necesidad de fármacos eficaces en la inhibición del complemento. A la fecha, eculizumab (Soliris®), ravulizumab (Ultomiris), ambos anticuerpos contra C5, y pegcetapoplan (Empaveli), un inhibidor de C3, son los únicos tres fármacos que actúan selectivamente sobre el complemento que han sido aprobados para uso en seres humanos. Aun así, C5 y C3 son moléculas efectoras ubicadas “corriente abajo” en el sistema del complemento, y ningún bloqueo de C5 o inhibición de C3 inhibe la activación del sistema del complemento. Por lo tanto, un inhibidor de los pasos

de iniciación de la activación del complemento tendría ventajas pronunciadas sobre un inhibidor del complemento “corriente abajo”.

RESUMEN

Se ofrece este resumen para presentar una selección de conceptos en una forma simplificada. Se los describirá más adelante en la Descripción detallada. Este resumen no pretende identificar las características clave del objeto reivindicado, ni tampoco pretende que se lo use como ayuda para determinar el alcance del objeto reivindicado.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a un antígeno de este que se unen específicamente a MASP-2. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a un antígeno de este se unen específicamente a un epítipo dentro del dominio serina·proteasa del MASP-2 humano. En algunas realizaciones, dicho epítipo está ubicado en los aminoácidos ⁴⁹⁶DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO:6) del MASP-2 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a un antígeno de este inhiben la activación del complemento por la vía de la lectina. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a un antígeno de este compiten por la unión de C4 a MASP-2.

También se indican en el presente documento polinucleótidos que codifican los anticuerpos monoclonales divulgados o los fragmentos de unión a un antígeno de estos, y los vectores de clonación o casetes de expresión que comprenden tales polinucleótidos.

También se indican en el presente documento células hospedadoras que expresan los anticuerpos monoclonales divulgados o los fragmentos de unión a un antígeno de estos, y los métodos de producción de estos comprenden el

cultivo de células hospedadoras en condiciones que permiten la expresión de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a un antígeno de estos y el aislamiento de los fragmentos de unión a un antígeno de estos.

También se indican en el presente documento métodos para inhibir la activación del complemento por la vía de la lectina en un mamífero, método que comprende la administración a un sujeto mamífero que lo necesita de una cantidad de una composición que comprende los anticuerpos monoclonales divulgados o los fragmentos de unión a un antígeno de estos en una cantidad suficiente para inhibir la activación del complemento por la vía de la lectina en el mamífero. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales divulgados o los fragmentos de unión a un antígeno de estos pueden usarse para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno relacionado con la vía de la lectina o que está en riesgo de padecerlo. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno relacionado con la vía de la lectina se selecciona entre una microangiopatía trombótica (TMA), una afección renal, una reacción inflamatoria como resultado de un trasplante de tejido o de órgano, una lesión isquémica por reperfusión, una complicación asociada con la diabetes, una enfermedad o un trastorno cardiovascular, un trastorno inflamatorio gastrointestinal, un trastorno pulmonar, una enfermedad o trastorno oftálmico, coagulación intravascular diseminada, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad venooclusiva y hemorragia alveolar difusa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas relacionadas de la presente invención serán apreciados con mayor facilidad a medida que los mismos se comprendan mejor por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, en donde:

La FIGURA 1 es un diagrama esquemático del sistema del complemento.

La FIGURA 2 es un diagrama que ilustra la estructura del dominio de la proteína MASP-2 humana.

La FIGURA 3 es una alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos inhibidores anti-MASP-2 (de ratones progenitores) mAb OMS850, mAb OMS860 y mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 2.

La FIGURA 4 ilustra gráficamente la unión del MASP-2 humano (fragmento CCP1-CCP2-SP) a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860, mAb OMS870 y del mAb OMS858, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 5A ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero humano a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860 y el mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 5B ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero de macaco cangrejero a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860 y el mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 5C ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero de ratas a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860 y el mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 5D ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero murino a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860 y el mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 6 ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C4b en el suero humano al 50% a cargo del mAb OMS850, mAb OMS860 y el mAb OMS870, según se describe en el Ejemplo 3.

La FIGURA 7 ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero humano a cargo del mAb OMS852, con diversas sustituciones de P53, según se describe en el Ejemplo 4.

La FIGURA 8A ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero humano de varias versiones humanizadas con potencial terapéutico del mAb OMS850, según se describe en el Ejemplo 4.

La FIGURA 8B ilustra gráficamente la inhibición, dependiente de la concentración, de la precipitación de C3b en el suero humano de varias versiones humanizadas con potencial terapéutico del mAb OMS850, según se describe en el Ejemplo 4.

La FIGURA 9A ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía clásica, según se describe en el Ejemplo 5.

La FIGURA 9B ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina, según se describe en el Ejemplo 5.

La FIGURA 9C ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en

condiciones de ensayo específicas de la vía alternativa, según se describe en el Ejemplo 5.

La FIGURA 10 muestra los resultados de un estudio de fijación a receptores en un instrumento (OCTET) de interferometría de biocapa (BLI) utilizando OMS858 biotinilado y un perfil de otros anticuerpos MASP-2, según se describe en el Ejemplo 6.

La FIGURA 11 es un diagrama esquemático que muestra la disposición del dominio serina·proteasa MASP-2 y el Fab mAb OMS858 y los contactos entre ellos, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 12 es un diagrama esquemático que muestra, en el lado izquierdo, el epítipo de MASP-2 al cual se une el mAb OMS858, que incluye los siguientes residuos en el dominio SP de MASP-2: ASP496, LYS503, SER506, PRO507, HIS508 y TRP513, y en el lado derecho, el paratopo del mAb OMS858 que se une al epítipo de MASP-2, donde el paratopo abarca dos parches conectados correspondientes con contribuciones de las cadenas ligera y pesada y, en particular, residuos de cadena pesada HIS33, ASP50, ASP52, ASP55, GLU57, HIS59 y residuos de cadena ligera TYR31, ARG30 y TRP90, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 13 ilustra las interacciones entre el paratopo del mAb OMS858 y el epítipo de MASP-2, según lo calculado por el software LigPlot+, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 14A ilustra la estructura tridimensional del epítipo de MASP-2 que comprende ASP496, LYS503, SER506, PRO507, HIS508 y TRP513, al cual se une el mAb OMS858, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 14B ilustra la estructura tridimensional del paratopo del mAb OMS858 que comprende HIS33, ASP50, ASP52, ASP55, GLU57, HIS59 de la cadena pesada y ARG30, TYR31 y TRP90 de la cadena ligera al cual se une MASP-2, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 15 ilustra los contactos entre el epítipo DIRMGTLKRLSPHYTQAW de MASP-2 (SEQ ID NO:6) y la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del mAb OMS858, según se describe en el Ejemplo 9.

La FIGURA 16 es una alineación de aminoácidos del dominio serina·proteasa (SP) de MASP-2 del MASP-2 humano (aa 445 a 686 de la SEQ ID NO:1); MASP-2 de macaco cangrejero (aa 445 a 686 de la SEQ ID NO:4); MASP-2 de perro (aa 445 a 686 de la SEQ ID NO:5); MASP-2 murino (aa 444 a 685 de la SEQ ID NO:2) y MASP-2 de rata (aa 444 a 685 de la SEQ ID NO:3), que muestra que el HIS508 del MASP-2 humano está conservado en macacos cangrejeros, en ratones y en ratas, pero no en perros, según se describe en el Ejemplo 10.

La FIGURA 17A ilustra gráficamente la actividad de la vía de la lectina en función del tiempo en macacos cangrejeros tras la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de OMS856, según se describe en el Ejemplo 11.

La FIGURA 17B ilustra gráficamente la actividad de la vía de la lectina en función del tiempo en macacos cangrejeros tras la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de OMS858, según se describe en el Ejemplo 11.

La FIGURA 18A ilustra gráficamente la actividad de la vía de la lectina en función del tiempo en macacos cangrejeros tras la administración subcutánea de 1,5 mg/kg de OMS856, según se describe en el Ejemplo 11.

La FIGURA 18B ilustra gráficamente la actividad de la vía de la lectina en función del tiempo en macacos cangrejeros tras la administración subcutánea de 1,5 mg/kg de OMS858, según se describe en el Ejemplo 11.

La FIGURA 19 ilustra gráficamente el tiempo transcurrido hasta la oclusión (TOC) en ratones a los que se les administró una dosis de búsqueda de OMS858, según se describe en el Ejemplo 12.

La FIGURA 20A ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía clásica, según se describe en el Ejemplo 13.

La FIGURA 20B ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina, según se describe en el Ejemplo 13.

La FIGURA 20C ilustra gráficamente el nivel de la precipitación de MAC en presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía alternativa, según se describe en el Ejemplo 13.

La FIGURA 21 ilustra gráficamente la farmacodinámica de la inhibición de OMS858 de la actividad de la vía de la lectina en macacos cangrejeros tras la exposición a 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg de OMS858 SC o 1 mg/kg de OMS585 IV, según se describe en el Ejemplo 16.

La FIGURA 22 ilustra gráficamente la relación entre la concentración sérica de OMS858 y los datos de respuesta PD (es decir, la inhibición de la vía de la lectina) en macacos cangrejeros, según se describe en el Ejemplo 16.

La FIGURA 23 ilustra gráficamente los parámetros farmacocinéticos de OMS858 en ratones y macacos cangrejeros tras la exposición a 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg de OMS858 SC o 1 mg/kg de OMS585 IV, según se describe en el Ejemplo 17. Se muestran los gráficos de concentración sérica media de OMS858 en función del tiempo tras la administración individual de IV o SC en ratones (panel izquierdo) y macacos (panel derecho).

La FIGURA 24 ilustra gráficamente la farmacodinámica de la inhibición de OMS858 de la actividad de la vía de la lectina en ratones tras la exposición a 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg de OMS858 SC o 1 mg/kg de OMS585 IV, según se describe en el Ejemplo 16.

La FIGURA 25 ilustra gráficamente la farmacocinética (PK) de OMS858 en sujetos humanos sanos. A los sujetos se les administró una dosis IV de OMS858 a 0,01 mg/kg (cohorte 1), 0,03 mg/kg (cohorte 2), 0,1 mg/kg (cohorte 3) o 0,3 mg/mL (cohorte 4). Se muestra la concentración de OMS858 detectada en muestras de suero de los sujetos en diversos puntos temporales tras la administración. La línea de puntos indica el límite inferior de la cuantificación para el ensayo utilizado, que es de 70 ng/mL.

La FIGURA 26 ilustra gráficamente la farmacodinámica (PD) de OMS858 en sujetos humanos sanos. A los sujetos se les administró una dosis IV de OMS858 a 0,01 mg/kg (cohorte 1), 0,03 mg/kg (cohorte 2), 0,1 mg/kg (cohorte 3) o 0,3 mg/kg (cohorte 4). Se muestra el grado de inhibición de la vía de la lectina del complemento, medido a través de la precipitación de C4 en diversos puntos

temporales tras la administración. También se muestran las mediciones en sujetos a los que se les administró placebo.

La FIGURA 27 ilustra gráficamente la relación de PK y PD para OMS858. Se muestra el grado de inhibición de la vía de la lectina a diferentes concentraciones de OMS858 para los sujetos a los que se les administró una dosis IV de OMS858 a 0,01 mg/kg (cohorte 1), 0,03 mg/kg (cohorte 2) o 0,1 mg/kg (cohorte 3). El EC₅₀ calculado es de 170 ng/mL y el EC₉₀ calculado es de 400 ng/mL.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

A menos que se definan específicamente en el presente documento, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo sentido que el que entienden los expertos en la técnica de la presente invención. Las siguientes definiciones se ofrecen con el objeto de proporcionar claridad con respecto a los términos como se los usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones para describir la presente invención. Más definiciones se describen a lo largo de la divulgación.

En las presentes descripciones, se entenderá que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo listado y, cuando corresponda, las fracciones de estos (tales como el décimo y centésimo de un número entero), a menos que se indique lo contrario o que resulte evidente a partir del contexto. Se entenderá que cualquier intervalo numérico listado en el presente documento en relación con cualquier característica física, tal como las subunidades poliméricas, el tamaño o el espesor, incluye cualquier número entero dentro del intervalo indicado y, cuando corresponda, las fracciones de estos, a menos que se indique lo contrario o que

resulte evidente a partir del contexto. Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” pretende especificar que el intervalo o valor proporcionado puede variar en un $\pm 10\%$ del intervalo o valor indicado, a menos que se indique lo contrario.

Se entenderá que los términos “un”, “uno/una”, “el”, “la” y “los/las”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a uno o más de los componentes a los que se hace referencia. El uso de la alternativa (p. ej., “o”) debe entenderse como una, ambas o cualquier combinación de las alternativas. Como se usan en el presente documento, los términos “incluye(n)”, “tienen(n)” y “comprende(n)” se emplean como sinónimos, y se prevé que los términos y variantes de estos se interpreten de manera no limitante.

Los términos “opcional” u “opcionalmente” significan que un elemento, componente, evento o circunstancia descritos posteriormente pueden ocurrir o no y que la descripción incluye instancias en las cuales el elemento, componente, evento o circunstancia ocurren e instancias en las que no.

Se entenderá que los constructos individuales o los grupos de constructos derivados de las diversas combinaciones de estructuras y subunidades descritas en el presente documento son divulgados por la presente solicitud con el mismo alcance que tendría si cada constructo o grupo de constructos se describiera individualmente. Así, la selección de estructuras particulares o de subunidades particulares queda dentro del alcance de la presente divulgación.

El término “que consiste esencialmente en” no es equivalente a “que comprende” y hace referencia a los materiales o pasos especificados de una reivindicación o a aquellos que no afectan materialmente las características básicas del objeto reivindicado. Por ejemplo, un dominio, región o módulo de proteínas (p. ej., un dominio de unión) o una proteína “consisten esencialmente en” una secuencias

de aminoácidos particular cuando la secuencia de aminoácidos de un dominio, región, módulo o proteína incluye extensiones, deleciones, mutaciones o una combinación de estas (p. ej., aminoácidos en el terminal amino o carboxi, o entre dominios) que, en combinación, contribuyen con a lo sumo un 20% (p. ej., a lo sumo un 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%) de la longitud de un dominio, región, módulo o proteína y no afectan sustancialmente la actividad (es decir, no reducen la actividad en más de un 50%, tales como no más de un 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 1%) de los dominios, regiones, módulos o proteína (p. ej., la afinidad de unión a su objetivo de una proteína de unión).

Como se usan en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” o “mejorar” hacen referencia al manejo terapéutico y médico de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. En general, se administra una dosis o esquema de tratamiento apropiados que comprenden un anticuerpo de la presente divulgación o un fragmento de unión a un antígeno de este, en cantidad suficiente para provocar un beneficio terapéutico o profiláctico. El beneficio terapéutico o profiláctico/preventivo incluye un desenlace clínico mejorado, la disminución o el alivio de los síntomas asociados con una enfermedad, una menor aparición de síntomas, una mejor calidad de vida, un estado sin enfermedad más prolongado, la disminución del grado de la enfermedad, la estabilización del cuadro clínico, el retraso o la prevención de la progresión de la enfermedad, la remisión, la supervivencia, la supervivencia prolongada o cualquier combinación de estos.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “cantidad eficaz” de un anticuerpo o de un fragmento de unión a un antígeno de este, un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora o de una composición de la presente divulgación hace referencia a una cantidad de la composición o molécula suficiente para provocar un efecto terapéutico, incluido un desenlace clínico mejorado, la disminución o el alivio de los síntomas asociados con una enfermedad, una menor aparición de síntomas, una mejor calidad de vida, un estado sin enfermedad más prolongado,

la disminución del grado de la enfermedad, la estabilización del cuadro clínico, el retraso de la progresión de la enfermedad, la remisión, la supervivencia, la supervivencia prolongada en una manera estadísticamente significativa. Al referirse a un principio activo individual, administrado solo, una cantidad terapéuticamente eficaz hace referencia a los efectos de ese principio activo o de una célula que expresa ese principio activo solo. Al referirse a una combinación, una cantidad terapéuticamente eficaz hace referencia a las cantidades combinadas de principios activos o de un principio activo complementario combinado con una célula que expresa un principio activo que produce un efecto terapéutico, ya sea administrado en forma seriada, secuenciada o simultánea.

Como se usa en el presente documento, “un sujeto” incluye a todos los mamíferos, incluidos, a mero título enunciativo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores. Un sujeto puede ser macho o hembra y puede tener cualquier edad adecuada, incluidos lactantes, crías, adolescentes, adultos y sujetos geriátricos.

Como se usa en el presente documento, “aminoácido” hace referencia a aminoácidos de origen natural y sintéticos, además de análogos de aminoácidos e imitaciones de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como también los aminoácidos que se modifican posteriormente, p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos hacen referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero mantienen la misma estructura

química básica que un aminoácido de origen natural. Los imitadores de aminoácidos hacen referencia a compuestos químicos que tienen una estructura diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Como se usa en el presente documento, “mutación” hace referencia a un cambio en la secuencia de una molécula de ácido nucleico o de una molécula de un polipéptido en comparación con una molécula de ácido nucleico o una molécula de un polipéptido de referencia o de tipo natural, respectivamente. Una mutación puede provocar diversos tipos de cambios diferentes en secuencia, incluidos sustitución, inserción o delección de nucleótido(s) o de aminoácido(s).

En el sentido más amplio, los aminoácidos de origen natural pueden dividirse en grupos teniendo en cuenta la característica química de la cadena lateral de los respectivos aminoácidos. Por un aminoácido “hidrófobo” se entiende Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys o Pro. Por un aminoácido “hidrófilo” se entiende Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg o His.

Una “sustitución conservadora” hace referencia a sustituciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión de una proteína en particular. Por lo general, las sustituciones conservadoras son aquellas en las que un residuo de aminoácidos sustituido se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tenga una cadena lateral similar. Las sustituciones conservadoras incluyen una sustitución hallada en uno de los siguientes grupos: grupo 1: alanina (Ala o A), glicina (Gly o G), serina (Ser o S), treonina (Thr o T); grupo 2: ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o Z); grupo 3: asparagina (Asn o N), glutamina (Gln o Q); grupo 4: arginina (Arg o R), lisina (Lys o K), histidina (His o H); grupo 5: isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), metionina (Met o M), valina (Val o V) y grupo 6: fenilalanina (Phe o F), tirosina (Tyr o Y), triptófano (Trp o W). Además o en forma alternativa, los aminoácidos pueden agruparse en

grupos de sustitución conservadora por función, estructura química o composición similares (p. ej., ácido, básico, alifático, aromático o con contenido de azufre). Por ejemplo, un agrupamiento alifático puede incluir, a efectos de sustitución, Gly, Ala, Val, Leu e Ile. Otros grupos de sustitución conservadora incluyen: con contenido de azufre: Met y cisteína (Cys o C); ácido: Asp, Glu, Asn y Gln; residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; residuos polares con carga negativa y sus amidas: Asp, Asn, Glu y Gln; residuos polares con carga positiva: His, Arg y Lys; residuos no polares, alifáticos, grandes: Met, Leu, Ile, Val y Cys, y residuos aromáticos grandes: Phe, Tyr y Trp. Puede encontrarse más información en Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company.

Como se usa en el presente documento, “proteína” o “péptido” o “polipéptido” hacen referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Las proteínas corresponden a polímeros de aminoácidos de origen natural, además de corresponder a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es una imitación química artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, y polímeros de aminoácidos de origen no natural. También se contemplan variantes de proteínas, péptidos y polipéptidos de esta divulgación. En determinadas realizaciones, las variantes de proteínas, péptidos y polipéptidos comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,9% idéntica a una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos definida o de referencia, según se describe en el presente documento.

“Molécula de ácido nucleico”, “oligonucleótido”, “polinucleótido” o “ácido polinucleico” hacen referencia a un compuesto polimérico u oligomérico que incluye nucleótidos con uniones covalentes, que puede estar formado por subunidades naturales (p. ej., bases purínicas o pirimidínicas) o subunidades no

naturales (p. ej., un anillo de morfolina). Las bases purínicas incluyen adenina, guanina, hipoxantina y xantina; las bases pirimidínicas incluyen uracilo, timina y citosina. Las moléculas de ácido nucleico incluyen ácido polirribonucleico (RNA), el que incluye, por ejemplo, mRNA, microARN, siARN, ARN genómico viral y ARN sintético, y ácido polidesoxirribonucleico (ADN), el que incluye, por ejemplo, cADN ; ADN genómico y ADN sintético. Tanto el ARN como el ADN pueden ser mono- o bicatenarios. Si son monocatenarios, la molécula de ácido nucleico puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos incluye todas las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Algunas versiones de las secuencias de nucleótidos también pueden incluir intrones en la medida en que los intrones se eliminen a través de mecanismos cotranscripcionales o postranscripcionales. En otras palabras, diferentes secuencias de nucleótidos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos como resultado de la redundancia o sinonimia del código genético, o mediante empalme.

También se contemplan variantes de moléculas de ácido nucleico de esta divulgación. Las variantes de moléculas de ácido nucleico son al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, y preferentemente un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,9% idénticas a una molécula de ácido nucleico de un polinucleótido definido o de referencia según se describe en el presente documento, o que se hibridan a un polinucleótido en condiciones estrictas de hibridación de cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a aproximadamente 65 a 68 °C, o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50% a aproximadamente 42 °C. Las variantes de moléculas de ácido nucleico retienen la capacidad de codificar un dominio de unión de estas con una funcionalidad descrita en el presente documento, tal como la unión a una molécula objetivo.

El “porcentaje de identidad de secuencia” hace referencia a una relación entre dos o más secuencias, según se determina por comparación de las secuencias. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia están diseñados para brindar la mejor coincidencia entre las secuencias en comparación. Por ejemplo, las secuencias están alineadas a efectos de una óptima comparación (p. ej., pueden introducirse espacios en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos para su óptima alineación). Además, pueden ignorarse las secuencias no homólogas a efectos de comparación. El porcentaje de identidad de secuencia al que se hace referencia en el presente documento se calcula en toda la longitud de la secuencia de referencia, a menos que se indique lo contrario. Los métodos para determinar la identidad y similitud de la secuencia pueden hallarse en programas informáticos disponibles para el público. Las alineaciones de secuencias y los cálculos de porcentaje de identidad pueden realizarse utilizando un programa BLAST (p. ej., BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN o BLASTX) o el software Megalign (DNASTAR). El algoritmo matemático utilizado en los programas BLAST puede hallarse en Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. Los parámetros apropiados para medir la alineación, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan, puede determinarse con métodos conocidos.

El término “aislado” significa que el material se elimina de su entorno original (p. ej., el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido de origen natural presentes en un animal vivo no están aislados, pero el mismo ácido nucleico o polipéptido, separado de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tal ácido nucleico podría ser parte de un vector, y/o tal ácido nucleico o polipéptido podrían ser parte de una composición (p. ej., un lisado celular), y aun así estar “aislados” en cuanto a que tal vector o composición no son parte del entorno natural del ácido

nucleico o del polipéptido. Además, “aislado” puede, en algunas realizaciones, describir un anticuerpo, fragmento de unión a un antígeno, polinucleótido, vector, célula hospedadora o composición que está fuera de un cuerpo humano.

El término “gen” implica el segmento de ADN o ARN involucrado en la producción de una cadena de polipéptidos; en determinados contextos, esto incluye regiones anteriores y posteriores a la región de codificación (p. ej., las regiones no traducidas [UTR] secuencia arriba y secuencia abajo), además de las secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

Una “variante funcional” hace referencia a un polipéptido o polinucleótido que es estructuralmente similar o que tiene una estructura sustancialmente similar a un compuesto precursor o de referencia de la presente divulgación, pero que difiere levemente en su composición (p. ej., uno o más grupos funcionales, átomos o bases son diferentes, están agregados o eliminados), de manera que el polipéptido o polipéptido codificado sea capaz de llevar a cabo al menos una función del polipéptido precursor con al menos un 50% de eficacia, preferentemente al menos un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% o 100% del grado de actividad del polipéptido precursor, o un grado de actividad superior al del polipéptido precursor. En otras palabras, una variante funcional de un polipéptido o polipéptido codificado de la presente divulgación tiene una “unión similar”, una “afinidad similar” o una “actividad similar” cuando la variante funcional exhibe una mejoría en el desempeño, o no más de una reducción del 50% en el desempeño, en un ensayo seleccionado en comparación con el polipéptido precursor o de referencia, tal como un ensayo para determinar la actividad enzimática o la afinidad de unión.

Tal como se utiliza en el presente documento, una “parte funcional” o “fragmento funcional” se refiere a un polipéptido o polinucleótido que comprende solo un

dominio, parte o fragmento de un compuesto parental o de referencia, y el polipéptido o polipéptido codificado retiene al menos un 50% de la actividad asociada al dominio, parte o fragmento del compuesto parental o de referencia, preferentemente al menos un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% o 100% del grado de actividad del polipéptido parental, o un grado de actividad mayor que el del polipéptido parental, o proporciona un beneficio biológico (p. ej., función efectora). Una “parte funcional” o “fragmento funcional” de un polipéptido o polipéptido codificado de la presente divulgación tiene una “unión similar” o una “actividad similar” cuando la parte o fragmento funcional muestra una mejora en el rendimiento, o no más de un 50% de reducción en el rendimiento, en un ensayo seleccionado en comparación con el polipéptido parental o de referencia (preferentemente no más de un 20% o un 10% de reducción, o no más de una diferencia logarítmica en comparación con el compuesto parental o de referencia con respecto a la afinidad).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “diseñado”, “recombinante” o “no natural” se refiere a un organismo, microorganismo, célula, proteína, polipéptido, molécula de ácido nucleico o vector que incluye al menos una alteración genética o que ha sido modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico exógena o heteróloga, donde dichas alteraciones o modificaciones se introducen mediante ingeniería genética (es decir, intervención humana). Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen moléculas de ácido nucleico expresables que codifican ARN funcional, proteínas, proteínas o enzimas de fusión, u otras adiciones de moléculas de ácido nucleico, deleciones, sustituciones u otras alteraciones funcionales del material genético de una célula. Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un polinucleótido, gen u operón.

Tal como se utiliza en el presente documento, “heterólogo”, “no endógeno” o “exógeno” se refiere a cualquier gen, proteína, compuesto, molécula de ácido nucleico o actividad que no es nativo de una célula hospedadora o sujeto, o cualquier gen, proteína, compuesto, molécula de ácido nucleico o actividad nativa de una célula hospedadora o sujeto que ha sido alterado. El término heterólogo, no endógeno o exógeno incluye genes, proteínas, compuestos o moléculas de ácido nucleico que han sido mutados o alterados de modo que la estructura, actividad o ambas son diferentes entre los genes, proteínas, compuestos o moléculas de ácido nucleico nativos y los alterados. En determinadas realizaciones, los genes, proteínas o moléculas de ácido nucleico heterólogos, no endógenos o exógenos (p. ej., receptores, ligandos, etc.) pueden no ser endógenos con respecto a una célula hospedadora o sujeto, sino que los ácidos nucleicos que codifican dichos genes, proteínas o moléculas de ácido nucleico pueden haber sido añadidos a una célula hospedadora por conjugación, transformación, transfección, electroporación o similares, donde la molécula de ácido nucleico añadida puede integrarse en el genoma de una célula hospedadora o puede existir como material genético extracromosómico (p. ej., como un plásmido u otro vector autorreplicante). El término “homólogo” u “homóloga” se refiere a un gen, proteína, compuesto, molécula de ácido nucleico o actividad que se encuentra en una cepa, especie o célula hospedadora o que se deriva de ella. Por ejemplo, un polinucleótido o gen heterólogo o exógeno que codifica un polipéptido puede ser homólogo con respecto a un polinucleótido o gen nativo y codificar un polipéptido o actividad homólogos, pero el polinucleótido o polipéptido puede tener una estructura, secuencia, grado de expresión o cualquier combinación de estos alterados. Un polinucleótido o gen no endógeno, así como el polipéptido o la actividad codificados, pueden ser de la misma especie, de una especie diferente o de una combinación de estas.

En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico o una parte de esta nativa de una célula hospedadora se considerará heteróloga con respecto

a la célula hospedadora si ha sido alterada o mutada, o una molécula de ácido nucleico nativa de una célula hospedadora puede considerarse heteróloga si ha sido alterada con una secuencia de control de expresión heteróloga o ha sido alterada con una secuencia de control de expresión endógena no asociada normalmente a la molécula de ácido nucleico nativa de una célula hospedadora. Además, el término “heterólogo” puede referirse a una actividad biológica diferente, alterada o no endógena con respecto a una célula hospedadora. Tal como se describe en el presente documento, se puede introducir más de una molécula de ácido nucleico heteróloga en una célula hospedadora como moléculas de ácido nucleico separadas, como una pluralidad de genes controlados individualmente, como una molécula de ácido nucleico policistónica, como una única molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (u otro polipéptido), o cualquier combinación de estos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “endógeno” o “nativo” se refiere a un polinucleótido, gen, proteína, compuesto, molécula o actividad que está normalmente presente en una célula hospedadora o un sujeto.

El término “expresión”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido según la secuencia de codificación de una molécula de ácido nucleico, tal como un gen. El proceso puede incluir transcripción, control postranscripcional, modificación postranscripcional, traducción, control postraducciona, modificación postraducciona o cualquier combinación de estos. Una molécula de ácido nucleico expresada está típicamente unida operativamente a una secuencia de control de expresión (p. ej., un promotor).

El término “unido operativamente” hace referencia a la asociación de dos o más moléculas de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico, de modo

que la función de una se vea afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante cuando es capaz de afectar la expresión de tal secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). “No unido” significa que los elementos genéticos asociados no están estrechamente relacionados entre sí y que la función de uno no afecta al otro.

Tal como se describe en el presente documento, se puede introducir más de una molécula de ácido nucleico heteróloga en una célula hospedadora como moléculas de ácido nucleico separadas, como una pluralidad de genes controlados individualmente, como una molécula de ácido nucleico policistrónica, como una única molécula de ácido nucleico que codifica una proteína (p. ej., una cadena pesada de un anticuerpo), o cualquier combinación de estos. Cuando se introducen dos o más moléculas de ácido nucleico heterólogas en una célula hospedadora, se entiende que las dos o más moléculas de ácido nucleico heterólogas pueden introducirse como una única molécula de ácido nucleico (p. ej., en un único vector), en vectores separados, integradas en el cromosoma hospedador en un único sitio o en múltiples sitios, o cualquier combinación de estos. El número de moléculas de ácido nucleico o actividades proteicas heterólogas a las que se hace referencia se refiere al número de moléculas de ácido nucleico codificantes diferentes o al número de actividades proteicas diferentes, no al número de moléculas de ácido nucleico separadas introducidas en una célula hospedadora.

El término “constructo” se refiere a cualquier polinucleótido que contiene una molécula de ácido nucleico recombinante (o, cuando el contexto lo indique claramente, una proteína de fusión de la presente divulgación). Un constructo (de polinucleótido) puede estar presente en un vector (p. ej., un vector bacteriano, un vector viral) o puede estar integrado en un genoma. Un “vector” es una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido

nucleico. Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus, un vector de ARN o una molécula de ADN o ARN lineal o circular que puede incluir moléculas de ácido nucleico cromosómicas, no cromosómicas, semisintéticas o sintéticas. Los vectores de la presente divulgación también incluyen sistemas de transposones (p. ej., Sleeping Beauty, véase, p. ej., Geurts *et al.*, Mol. Ther. 8:108, 2003; Mátés *et al.*, Nat. Genet. 41:753, 2009). Los vectores ejemplares son aquellos capaces de replicarse de forma autónoma (vector episomal), capaces de suministrar un polinucleótido a un genoma celular (p. ej., vector viral) o capaces de expresar moléculas de ácido nucleico a las que están unidos (vectores de expresión).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “vector de expresión”, “vector de clonación” o “vector” se refiere a un constructo de ADN que contiene una molécula de ácido nucleico que está unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de la molécula de ácido nucleico en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control suelen incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios adecuados de unión al ribosoma del mRNA y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, un virus o simplemente una inserción genómica potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma o introducir el polinucleótido contenido en el vector en el genoma sin la secuencia vectorial. En la presente memoria, “plásmido”, “plásmido de expresión”, “virus” y “vector” suelen utilizarse de forma intercambiable.

El término “introducido” en el contexto de la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, significa “transfección”, “transformación” o “transducción”

e incluye la referencia a la incorporación de una molécula de ácido nucleico en una célula eucariota o procariótica, donde la molécula de ácido nucleico puede incorporarse al genoma de una célula (p. ej., ADN cromosómico, plásmido, plástido o mitocondrial), convertida en un replicón autónomo o expresada de forma transitoria (p. ej., mRNA transfectado).

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden estar unidos operativamente a ciertos elementos de un vector. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos necesarias para afectar a la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se ligan pueden estar unidas operativamente. Las secuencias de control de expresión pueden incluir secuencias de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de transcripción adecuadas; señales de procesamiento de ARN eficaces, tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplásmico; secuencias que aumentan la eficacia de traducción (es decir, secuencias consenso de Kozak); secuencias que aumentan la estabilidad de las proteínas; y posiblemente secuencias que aumentan la secreción de proteínas. Las secuencias de control de expresión pueden estar unidas operativamente si son contiguas al gen de interés, y las secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés también pueden considerarse unidas operativamente.

En determinadas realizaciones, el vector comprende un vector plasmídico o un vector viral (p. ej., un vector lentiviral o un vector γ -retroviral). Los vectores virales incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (p. ej., virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa, tales como ortomixovirus (p. ej., virus de la gripe), rhabdovirus (p. ej., virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (p. ej., sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN bicatenarios, incluidos adenovirus, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus

de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (p. ej., vaccinia, viruela aviar y viruela canaria). Otros virus incluyen, por ejemplo, virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis. Algunos ejemplos de retrovirus incluyen leucosis o sarcoma aviar, virus de tipo C de mamíferos, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields *et al.*, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Los métodos de uso de vectores virales retrovirales y lentivirales y células de empaquetado para transducir células hospedadoras de mamíferos con partículas virales que contienen transgenes son conocidos en la técnica y se han descrito anteriormente, por ejemplo, en: U.S. Patent 8,119,772; Walchli *et al.*, PLoS One 6:327930, 2011; Zhao *et al.*, J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels *et al.*, Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha *et al.*, Mol. Ther. 18:1748, 2010; y Verhoeven *et al.*, Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. También están disponibles comercialmente constructos de vectores retrovirales y lentivirales y sistemas de expresión. Además, pueden utilizarse otros vectores virales para el suministro de polinucleótidos, incluidos los vectores virales de ADN, por ejemplo, vectores basados en adenovirus y vectores basados en el virus adenoasociado (AAV); vectores derivados de virus del herpes simple (HSV), incluidos vectores de amplicón, HSV de replicación defectuosa y HSV atenuados (Krisky *et al.*, Gene Ther. 5:1517, 1998).

Otros vectores que pueden utilizarse con las composiciones y métodos de esta divulgación incluyen los derivados de baculovirus y α -virus. (Jolly, D J. 1999. *Emerging Viral Vectors*. pp 209-40 in Friedmann T. ed. *The Development of Human Gene Therapy*. New York: Cold Spring Harbor Lab), o vectores plasmídicos (tales como Sleeping Beauty u otros vectores de transposones). Cuando un genoma vectorial viral comprende una pluralidad de polinucleótidos que deben expresarse en una célula hospedadora como transcritos separados, el vector viral también puede comprender otras secuencias entre los dos (o más)

transcriptos que permitan la expresión bicistrónica o multicistrónica. Los ejemplos de dichas secuencias utilizadas en vectores virales incluyen sitios de entrada al ribosoma interno (IRES), sitios de escisión de furina, péptido viral 2A o cualquier combinación de estos.

Los vectores plasmídicos, incluidos los vectores plasmídicos basados en ADN para la expresión de una o más proteínas *in vitro* o para la administración directa a un sujeto, también son conocidos en la técnica. Dichos vectores pueden comprender un origen bacteriano de replicación, un origen viral de replicación, genes que codifican componentes necesarios para la replicación del plásmido y/o uno o más marcadores selectivos, y también pueden contener otras secuencias que permitan la expresión bicistrónica o multicistrónica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “hospedador” u “hospedadora” se refiere a una célula o microorganismo destinado a la modificación genética con una molécula de ácido nucleico heteróloga para producir un polipéptido de interés (p. ej., un anticuerpo de la presente divulgación).

Una célula hospedadora puede incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda recibir un vector o la incorporación de ácidos nucleicos o expresar proteínas. El término también abarca la progenie de la célula hospedadora, ya sea genética o fenotípicamente igual o diferente. Las células hospedadoras adecuadas pueden depender del vector y pueden incluir células de mamíferos, células animales, células humanas, células de simios, células de insectos, células de levadura y células bacterianas. Estas células pueden inducirse a incorporar el vector u otro material mediante el uso de un vector viral, transformación a través de la precipitación de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, microinyección u otros métodos. Véase, por ejemplo, Sambrook

et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

“Antígeno”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula inmunogénica que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos, la activación de células específicas inmunológicamente competentes, la activación del complemento, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o cualquier combinación de estas. Un antígeno (molécula inmunogénica) puede ser, por ejemplo, un péptido, glucopéptido, polipéptido, glucopolipéptido, polinucleótido, polisacárido, lípido o similar. Es evidente que un antígeno puede sintetizarse, producirse de forma recombinante o derivarse de una muestra biológica. Las muestras biológicas ejemplares que pueden contener uno o más antígenos incluyen muestras de tejido, muestras de heces, células, fluidos biológicos o combinaciones de estos. Los antígenos pueden producirse por células que han sido modificadas o diseñadas genéticamente para expresar un antígeno. Los antígenos también pueden estar presentes en un agente infeccioso, tal como los presentes en un virión, o expresarse o presentarse en la superficie de una célula infectada por un agente infeccioso.

El término “epítipo” o “epítipo antigénico” incluye cualquier molécula, estructura, secuencia de aminoácidos o determinante proteínico que es reconocido y está unido específicamente por una molécula de unión afín, tal como una inmunoglobulina, u otra molécula, dominio o proteína de unión. Los determinantes epitópicos suelen contener grupos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y pueden tener características estructurales específicas tridimensionales, así como características de carga específica. Cuando un antígeno es o comprende un péptido o una proteína, el epítipo puede estar compuesto por aminoácidos consecutivos (p. ej., un epítipo lineal), o puede estar compuesto por

aminoácidos de diferentes partes o regiones de la proteína que se acercan por el plegado de la proteína (p. ej., un epítipo discontinuo o conformacional), o aminoácidos no contiguos que están en estrecha proximidad independientemente del plegado de la proteína.

El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que consiste en uno o más polipéptidos que se une específicamente a un antígeno a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítopos. Por ejemplo, el término “anticuerpo” abarca un anticuerpo intacto que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conectadas por enlaces disulfuro, así como cualquier parte o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo intacto que tenga o conserve la capacidad de unirse a la molécula objetivo de antígeno reconocida por el anticuerpo intacto, tal como un fragmento scFv, Fab o Fab’2. El término también abarca la longitud completa o los fragmentos de anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluidas IgG y subclases de esta (tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgE, IgA e IgD.

El término “anticuerpo” se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio, y abarca los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de estos, derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (p. ej., ratón, rata, conejo y primates, incluido el ser humano) o de un hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante o animales transgénicos (u otros métodos de producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos). No se pretende que el término “anticuerpo” se limite en cuanto a la fuente del anticuerpo o a la forma en que se obtiene (p. ej., por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animal transgénico, síntesis de péptidos, etc.). Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes; anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos); anticuerpos humanizados; anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos murinos; anticuerpos monoclonales quiméricos, de humano y ratón, de primate y ratón, de

humano y primate; y anticuerpos antiidiotipo, y pueden ser cualquier molécula intacta o fragmento de esta. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” abarca no solo los anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también los fragmentos de estos (tal como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (ScFv), variantes sintéticas de estos, variantes naturales, proteínas de fusión que comprenden una parte del anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de unión a antígeno o un fragmento (sitio de reconocimiento de epítomos) de la especificidad requerida. El término abarca las formas de inmunoglobulinas diseñadas genéticamente o de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem y similares, incluidos los fragmentos de unión a antígenos de estos.

Los términos “VH” y “VL” se refieren a las regiones de unión variable de una cadena pesada de anticuerpos y de una cadena ligera de anticuerpos, respectivamente. Una VL puede ser una cadena de clase kappa o de clase lambda. Las regiones de unión variable comprenden subregiones separadas y bien definidas, conocidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones estructurales (FR). Las CDR se encuentran dentro de una región hipervariable (HVR) del anticuerpo y se refieren a secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo que, en general, confieren conjuntamente la especificidad del antígeno y/o la afinidad de unión del anticuerpo. Las CDR consecutivas (es decir, CDR1 y CDR2, y CDR2 y CDR3) están separadas entre sí en la estructura primaria por una región marco.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “ticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad que derivan de un anticuerpo de una

especie no humana (p. ej., roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se deriva de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico está compuesto por un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo unido operativamente o fusionado de otro modo a una parte Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico de ratón y humano puede comprender un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón fusionado a una parte Fc derivada de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente a la del anticuerpo parental, que comprende IgA (incluidas las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluidas las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo humanizado” es una molécula, generalmente preparada mediante técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva de una inmunoglobulina de una especie no humana, y la estructura restante de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado difiere de un anticuerpo quimérico en que normalmente solo se utilizan las CDRs de la especie no humana, injertadas en regiones estructurales adecuadas en un dominio variable humano. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo natural o pueden ser modificados por una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDRs (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDRs de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDRs (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, lo que también denomina una o más CDR “derivadas de” una o más CDRs del anticuerpo original.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una parte derivada de o relacionada con un anticuerpo de longitud completa, que por lo general incluye la región variable o de unión a antígeno de este. Los ejemplos ilustrativos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2 y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos una CDR de una inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera que se une específicamente al antígeno con el que se generó el anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR de una secuencia VH y VL de un anticuerpo.

Un “Fab” (fragmento de unión a antígeno) es la parte de un anticuerpo que se une a los antígenos e incluye la región variable y el CH1 de la cadena pesada unidos a la cadena ligera por medio de un enlace disulfuro intercatenario. Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno; es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento de un anticuerpo con pepsina da como resultado un gran fragmento único F(ab')2 que se corresponde aproximadamente con dos fragmentos Fab unidos a disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y que aún puede realizar una unión cruzada con el antígeno. Tanto el Fab como el F(ab')2 son ejemplos de “fragmentos de unión a antígeno”. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos complementarios en el carboxi-terminal del dominio CH1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación empleada en el presente documento para el Fab' en el cual los residuos de cisteína del dominio constante llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2 suelen producirse como

pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos Fab pueden unirse, p. ej., mediante un conector peptídico, para formar un Fab monocatenario, también denominado en el presente documento como "scFab". En estas realizaciones, un enlace disulfuro intercatenario que está presente en un Fab nativo puede no estar presente, y el conector sirve en su totalidad o en parte para ligar o conectar los fragmentos Fab en una única cadena polipeptídica. Un fragmento Fab derivado de la cadena pesada (p. ej., que comprende, consiste en o se compone esencialmente de VH + CH1, o "Fd") y un fragmento Fab derivado de la cadena ligera (p. ej., que comprende, consiste en o se compone esencialmente de VL + CL) pueden unirse en cualquier disposición para formar un scFab. Por ejemplo, un scFab puede estar dispuesto en dirección N-terminal a C-terminal, según (fragmento Fab de cadena pesada-conector-fragmento Fab de cadena ligera) o (fragmento Fab de cadena ligera-conector-fragmento Fab de cadena pesada).

"Fv" es un fragmento pequeño de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno y reconocimiento de antígenos completo. Por lo general, este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque típicamente con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpos VH y VL conectados en una única cadena polipeptídica. El polipéptido scFv puede comprender un conector polipeptídico dispuesto entre los dominios VH y VL y que los une, lo

que permite que el scFv conserve o forme la estructura deseada para la unión a antígeno, aunque no siempre se requiere un conector. Dicho conector peptídico puede incorporarse a un polipéptido de fusión mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Además, o alternativamente, el Fv puede tener un enlace disulfuro formado entre VH y VL que las estabiliza. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un scFv que comprende un dominio VH, un dominio VL y un conector peptídico que une el dominio VH al dominio VL. En realizaciones particulares, un scFv comprende un dominio VH unido a un dominio VL mediante un conector peptídico, que puede estar en una orientación VH-conector-VL o en una orientación VL-conector-VH. Cualquier scFv de la presente divulgación puede diseñarse de modo que el extremo C-terminal del dominio VL esté unido por una secuencia peptídica corta al extremo N-terminal del dominio VH, o viceversa (es decir, [N]VL[C]-conector-[N]VH[C] o [N]VH[C]-conector-[N]VL[C]). Alternativamente, en algunas realizaciones, un conector puede estar unido a una parte o extremo N-terminal del dominio VH, del dominio VL, o de ambos.

Las secuencias conectoras peptídicas para su uso en scFv o en otras proteínas de fusión, tales como las moléculas activadoras del complemento dirigidas descritas en el presente documento, pueden elegirse, por ejemplo, según: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad o falta de capacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos y/o en una molécula objetivo; y/o (3) la falta o ausencia relativa de residuos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los polipéptidos y/o la molécula objetivo. Otras consideraciones relativas al diseño del conector (p. ej., la longitud) pueden incluir la conformación o el intervalo de conformaciones en las que VH y VL pueden formar un sitio funcional de unión a antígeno. En determinadas

realizaciones, las secuencias conectoras peptídicas contienen, por ejemplo, residuos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, también pueden incluirse en una secuencia conectora. Otras secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como conector incluyen las divulgadas en Maratea *et al.*, Gene 40:39 46(1985); Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); patente de los EE. UU. n.º 4,935,233 y patente de los EE. UU. n.º 4,751,180. Puede utilizarse cualquier conector adecuado, y en general puede tener una longitud de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 aminoácidos, o menos de aproximadamente 200 aminoácidos, y preferentemente comprenderá una estructura flexible (puede proporcionar flexibilidad y espacio para el movimiento conformacional entre dos regiones, dominios, motivos, fragmentos o módulos conectados por el conector), y preferentemente será biológicamente inerte y/o tendrá un bajo riesgo de inmunogenicidad en un humano.

Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos (p. ej., se unen a un único epítopo) o multiespecíficos (p. ej., se unen a múltiples epítopos y/o moléculas objetivo). Un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno puede, en algunas realizaciones, comprender uno, dos o más dominios de unión a antígeno (p. ej., una VH y una VL). Pueden estar presentes dos o más dominios de unión que se unen al mismo epítopo o a diferentes epítopos, y un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o fragmento de unión a antígeno como el que se proporciona en el presente documento puede, en algunas realizaciones, tener dos o más dominios de unión, que se unen a diferentes antígenos o patógenos en conjunto.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden construirse en varios formatos. Los formatos ejemplares de anticuerpos divulgados en Spiess *et al.*, Mol. Immunol. 67(2):95 (2015) y Brinkmann and Kontermann, mAbs 9(2):182-212 (2017), cuyos formatos y métodos de elaboración se incorporan en el

presente documento por referencia e incluyen, por ejemplo, activadores biespecíficos de células T (BiTE), DART, conjuntos Knobs-Into-Holes (KIH), conjuntos scFv-CH3-KIH, anticuerpos de cadena ligera comunes KIH, TandAbs, cuerpos triples, minicuerpos TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')₂-scFv₂, HCab tetravalentes, intracuerpos, CrossMabs, Fab de doble acción (DAF) (dos en uno o cuatro en uno), DutaMabs, DT-IgG, pares de carga, intercambio de Fab-arm, SEEDbodies, Triomabs, conjuntos LUZ-Y, Fcabs, κλ-cuerpos, Fabs ortogonales, DVD-Igs (p. ej., patente de los EE. UU. n.º 8,258,268, cuyos formatos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody y DVI-IgG (cuatro en uno), así como los denominados FIT-Ig (p. ej., publicación 5 del PCT n.º WO 2015/103072, cuyos formatos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad), los denominados formatos WuxiBody (p. ej., publicación del PCT n.º WO 2019/057122, cuyos formatos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad) y los denominados formatos In-Elbow-Insert Ig (IEI-Ig; p. ej., publicación del PCT n.º WO 2019/024979 y WO 2019/025391, cuyos formatos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad).

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender dos o más dominios VH, dos o más dominios VL, o ambos (es decir, dos o más dominios VH y dos o más dominios VL). En realizaciones particulares, un fragmento de unión a antígeno comprende el formato (dirección N-terminal a C-terminal) VH-conector-VL-conector-VH-conector-VL, donde las dos secuencias VH pueden ser iguales o diferentes y las dos secuencias VL pueden ser iguales o diferentes. Dichos scFv conectados pueden incluir cualquier combinación de dominios VH y VL dispuestos para unirse a un objetivo determinada, y en los formatos que comprenden dos o más VH y/o dos o más VL pueden unirse uno, dos o más epítopos o antígenos diferentes. Se apreciará que los formatos que incorporan

múltiples dominios de unión a antígeno pueden incluir secuencias VH y/o VL en cualquier combinación u orientación. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede comprender el formato VL-conector-VH-conector-VL-conector-VH, VH-conector-VL-conector-VH o VL-conector-VH-conector-VL.

Tal como se utiliza en el presente documento, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no pretende limitarse en lo que respecta a la fuente del anticuerpo o la forma en que se elabora (p. ej., mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término “anticuerpo monoclonal” abarca no solo los anticuerpos monoclonales intactos y los anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también los fragmentos de estos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (ScFv), variantes de estos, proteínas de fusión que comprenden una parte de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítopos) de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un epítopo. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo, tal como el método de hibridoma descrito por Kohler, G., *et al.*, Nature 256:495, 1975, o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., patentes de los EE. UU. n.º 4,816,567 de Cabilly). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de colecciones de anticuerpos en fagos mediante 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, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de estas.

Los polipéptidos de inmunoglobulina reconocidos incluyen las cadenas ligeras kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, o equivalentes en otras especies. Las “cadenas ligeras” de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) comprenden una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos en el NH₂-terminal y una región constante kappa o lambda en el COOH-terminal. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos) comprenden igualmente una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las regiones constantes de la cadena pesada antes mencionadas, p. ej., gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos).

La unidad básica de anticuerpo de cuatro cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM difiere de este plan en que consiste en cinco de las unidades básicas de heterotetrámero junto con otro polipéptido llamado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno. Los anticuerpos IgA secretados también difieren de la estructura básica en que pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes que comprenden de dos a cinco de las unidades básicas de cuatro cadenas junto con una cadena J. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro en función del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. El emparejamiento de una VH junto a una VL forma un sitio de unión a antígeno simple.

Cada cadena H tiene, en el N-terminal, un dominio variable (VH) seguido de tres dominios constantes (CH₁, CH₂, CH₃), en el caso de las cadenas alfa, gamma

y delta, o cuatro dominios CH (CH1, CH2, CH3, CH4), en el caso de las cadenas mu y épsilon.

Cada cadena L tiene, en el N-terminal, un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante (CL) en su otro extremo. Cuando una cadena L y una cadena H están emparejadas, la VL se alinea con la VH y el CL se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). La cadena L de cualquier especie vertebrada puede asignarse a uno de los dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes (CL).

Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH). Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. A su vez, las clases γ y α se dividen en subclases sobre la base de pequeñas diferencias en la secuencia y la función de CH, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, p. ej., Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds); Appleton and Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6.

El término “variable” se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios V se diferencian ampliamente en cuanto a la secuencia entre anticuerpos. El dominio V actúa como mediador de la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en todo el tramo

de 110 aminoácidos de los dominios variables. Más bien, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones de marco (FR) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” que tienen una longitud de 9 a 12 aminoácidos. Estos dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden, cada uno, cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración con β -pliegue, conectados por tres regiones hipervariables, que forman asas que conectan la estructura con n-pliegue y, en algunos casos, forman parte de esta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables desde la otra cadena, contribuyen a la formación del lado de unión a antígeno (véase Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991)). Los dominios de la constante no están directamente involucrados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, aunque muestran varias funciones efectoras.

Tal y como se utilizó en el presente documento, “funciones efectoras” se refiere a aquellas actividades biológicas atribuidas a la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras de un anticuerpo incluyen la participación en la citotoxicidad (ADCC), la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente del complemento, la unión al receptor de Fc, la fagocitosis, la disminución de los receptores de superficie celular y la activación de la célula B. Se pueden hacer modificaciones, tales como las sustituciones de aminoácidos a un dominio Fc a fin de modificar (p. ej., aumentar o reducir) una o más funciones de un polipéptido que contienen Fc. Tales funciones incluyen, por ejemplo la unión al receptor Fc, la modulación de semivida del anticuerpo, la función ADCC, la unión a proteína A, la unión a proteína G y la unión al complemento. Las modificaciones de aminoácidos que modifican las funciones de Fc incluyen, por ejemplo, T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F, M428L/N434S, E233P/L234V/L235A/G236 Δ /A327G/A330S/P331S, E333A,

S239D/A330L/I332E, P257I/Q311, K326W/E333S, S239D/I332E/G236A, N297Q, K322A, S228P, L235E/E318A/K320A/K322A, L234A/L235A, y mutaciones L234A/L235A/P329G. Otras modificaciones de Fc y su efecto sobre la función de Fc se conocen en la técnica.

El término “región hipervariable”, tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable contiene varias “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR). La cadena pesada comprende tres secuencias de CDR (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y la cadena ligera comprende tres secuencias de CDR (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). Una o más de una serie de sistemas existe para identificar y numerar los aminoácidos que conforman las CDR. Por ejemplo, la región hipervariable generalmente comprende las CDR en torno a aproximadamente los residuos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) y 89 a 97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y en torno a aproximadamente 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) y 95 a 102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada cuando se numera de conformidad con el sistema de numeración de Kabat como se describe en Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991); y/o en aproximadamente los residuos 24 a 34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 52-56 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada cuando se numera de conformidad con el sistema de numeración de Chothia, como se describe en Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); y/o en aproximadamente los residuos 27 a 38 (L1), 56 a 65 (L2) y 105 a 117 (L3) en la VL, y 27 a 38 (H1), 56 a 65 (H2) y 105 a 117 (H3) en la VH cuando se numeran de conformidad con el sistema de numeración IMGT como se describe en Lefranc, J.P., *et al.*, Nucleic Acids Res 27:209-212; Ruiz, M., *et al.*, Nucleic Acids Res 28:219-221 (2000). Las posiciones de residuos equivalentes pueden anotarse y compararse para diferentes moléculas con la herramienta de *software*

de numeración de los receptores de antígeno y clasificación de los receptores (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15:298-300). En consecuencia, la identificación de las CDR de una secuencia de dominio variable ejemplar (VH o VL) como se proporciona en el presente documento, según un esquema de numeración no es exclusiva de un anticuerpo que comprende CDR del mismo dominio variable como se determina mediante el uso de un esquema de numeración diferente.

Tal y como se utilizan en el presente documento, “específicamente se une” se refiere a un fragmento de unión a antígeno o a anticuerpo que se une a un antígeno con una afinidad particular, si bien no se asocia ni une significativamente con cualquiera de otras moléculas o componentes en una muestra. La afinidad puede definirse como una constante de asociación de equilibrio (K_a), calculada como la relación entre k_{on}/k_{off} , con unidades de $1/M$ o como una constante de disociación de equilibrio (K_d), calculada como la relación de k_{off}/k_{on} con unidades de M .

En algunos contextos, el anticuerpo y los fragmentos de unión a antígeno pueden describirse con referencia a la afinidad y/o aidez por el antígeno. A menos que se indique lo contrario, la aidez se refiere a la fuerza total de unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este con el antígeno y refleja la afinidad de unión, la valencia del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno (p. ej., si el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más sitios de unión) y, por ejemplo, si está presente otro agente que pueda afectar la unión (p. ej., un inhibidor no competitivo del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno).

A cada realización en esta memoria se debe solicitar *mutatis mutandis* a cada otra realización a menos que se establezca expresamente lo contrario. Se contempla que cualquier realización analizada en esta memoria puede implementarse con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de

la invención y viceversa. Asimismo, las composiciones de la invención pueden utilizarse para alcanzar métodos de la invención.

II Descripción general

La presente divulgación proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos que unen a MASP-2 humana, el activador de la vía de la lectina del sistema del complemento. Las lectinas, tal como la MBL, la M-ficolina, la H-ficolina, la L-ficolina, la colectina-10 y la colectina-11, son las moléculas de reconocimiento específicas que activan el sistema innato del complemento. El sistema del complemento también incluye el asa de amplificación de la vía terminal que amplifica la activación del complemento iniciada por la lectina, lo que da lugar a la liberación de mayores cantidades de moléculas efectoras terminales del complemento.

Además de su función esencial en la defensa inmunitaria, el sistema de complemento contribuye al daño de tejido en muchas afecciones clínicas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de crear inhibidores del complemento terapéuticamente eficaces para prevenir estos efectos adversos. Con el reconocimiento de que es posible inhibir la vía de la lectina del complemento al tiempo que dejan intactas las vías clásicas y alternativas, se llega a la conclusión de que sería muy conveniente inhibir específicamente solamente el sistema de activación del complemento causante de una patología concreta sin desactivar por completo las capacidades de defensa inmunitaria del complemento. Por ejemplo, en estados de enfermedad en los que la activación del complemento está mediada predominantemente por la vía de la lectina, sería beneficioso inhibir específicamente solamente esta vía. Esto dejaría la vía clásica del complemento intacta para manejar el procesamiento de complejos inmunitarios y ayudar a la defensa del hospedador contra la infección.

Un componente del sistema del complemento que es un posible objetivo en la aparición de agentes terapéuticos para inhibir específicamente la vía de la lectina es la MASP-2. De todos los componentes proteicos conocidos del sistema del complemento dependiente de las lectinas (tal como MBL, H ficolina, M ficolina, L ficolina, colectinas, MASP-1, MASP-2, C4 y C2), solamente MASP-1 y MASP-2 son exclusivas de la vía de la lectina y necesarias para el funcionamiento del sistema. Las lectinas (tal como la MBL, la H ficolina, la M ficolina, la L ficolina, la colectina-10 y la colectina-11) son también componentes únicos en la vía de la lectina. Sin embargo, la pérdida de uno cualquiera de los componentes de la lectina no inhibiría necesariamente la activación del sistema debido a la redundancia de la lectina. Sería necesario inhibir todas las lectinas para garantizar la inhibición del sistema de activación del complemento dependiente de la lectina. Además, dado que también se sabe que la MBL y las ficolinas tienen una actividad opsonica independiente del complemento, la inhibición de la función de la vía de la lectina provocaría la pérdida de este beneficioso mecanismo de defensa del hospedador contra la infección. Por el contrario, la actividad opsonica independiente del complemento permanece intacta cuando MASP-2 es el objetivo inhibitorio. Otra ventaja de MASP-2 como objetivo terapéutico para inhibir la vía de la lectina es que la concentración plasmática de MASP-2 se encuentra entre las más bajas de cualquier proteína del complemento (≈ 500 ng/mL); por lo tanto, concentraciones correspondientemente bajas de inhibidores de alta afinidad de MASP-2 pueden ser suficientes para obtener una inhibición completa (Moller Kristensen, M., *et al.*, J. Immunol Methods 282:159-167, 2003). Esto está en marcado contraste con MASP-1, que tiene una concentración plasmática de ~ 10.000 ng/mL, y por lo tanto se espera que sean necesarias concentraciones sustancialmente más altas de inhibidores de alta afinidad de MASP-1 para obtener una inhibición completa.

III. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

En el presente documento se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos que se unen específicamente a MASP-2. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos son anticuerpos monoclonales aislados o fragmentos de unión a antígeno de estos. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos inhiben la activación del complemento por la vía de la lectina. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o anticuerpos de murina o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores. Asimismo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos pueden ser anticuerpos de cadena simple, ScFv, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, anticuerpos univalentes que carecen de una región bisagra o de anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos pueden ser monovalentes, bivalentes o multivalentes.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno como se describe en el presente documento comprenden una región constante de la inmunoglobulina. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos pueden ser las inmunoglobulinas o los fragmentos de estos. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina IgG es una inmunoglobulina IgG1, IgG2 o IgG4.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos descritos en el presente documento se unen específicamente a un epítipo ubicado dentro del dominio de la serina proteasa de MASP-2 humano. En algunas realizaciones, el epítipo se ubica dentro de los aminoácidos ⁴⁹⁶DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO: 6) de MASP-2 humana. En

algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de este compiten con la unión a C4 a MASP-2.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno de este, que se une a MASP-2 que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 que tiene la secuencia NXXMH, donde X en la posición 2 es H o Y y donde X en la posición 3 es H o W; una HC-CDR2 establecida como la SEQ ID NO: 63 (DIDXSDSEXXYXXKFKD) donde X en la posición 4 es P o A; y donde X en la posición 9 es T o I, y donde X en la posición 10 es H o Y, y donde X en la posición 12 es I o N; y donde X en la posición 13 es E o Q; y una HC-CDR3 establecida como la SEQ ID NO: 18 (GDITTTLRIFYDV); y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 establecida como la SEQ ID NO: 64 (SASSSVXYMY) en la que X en la posición 7 es R o S; una LC-CDR2 establecida como la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS) y una LC-CDR3 establecida como la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT). En una realización, la HC-CDR1 de la región variable de cadena pesada según (a) comprende la SEQ ID NO: 14 (NYWMH).

En algunas realizaciones, la HC-CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 14 (NYWMH). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 56 (NYHMH). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 57 (NHHMH).

En algunas realizaciones, la HC-CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 16 (DIDPSDSETHYIEKFKD). En algunas realizaciones, la HC-CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD). En algunas realizaciones, la HC-CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 53 (DIDASDSETHYIEKFKD).

En algunas realizaciones, la LC-CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 32 (SASSSVRYMY). En algunas realizaciones, la LC-CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 39 (SASSSVSYMY).

En algunas realizaciones, el HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 14; la SEQ ID NO: 56 o la SEQ ID NO: 57, el HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 53, el HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 y el LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 14; la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 53 y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 56; la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 53 y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 57; la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 53 y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36.

En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 16 (DIDPSDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (GDITTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID

NO: 14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 56 (NYHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 53 (DIDASDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 57 (NHHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 53 ((DIDASDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT). En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:22 (DIDPSDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 39 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36 (QQWSSYPLT).

En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 14; la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 22 y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 18 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 39, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 34 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 36.

En algunas realizaciones, la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 25, la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 27 y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:

29 y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 41, la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 43 y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 45.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49 o la SEQ ID NO: 50. En otras realizaciones más, la región variable de cadena pesada es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49 o la SEQ ID NO: 50. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 47. En otras realizaciones más, la región variable de cadena ligera es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 47. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 46, la SEQ ID NO: 48, la SEQ ID NO: 49 o la SEQ ID NO: 50 y la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 47.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 o la SEQ ID NO 50. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntico a la SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 o la SEQ ID NO 50. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 47. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO 47. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 46, SEQ ID NO 48, SEQ ID NO 49 o la SEQ ID NO 50 y la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 47.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 8. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO 8. En

algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 11. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO 11. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 8 y la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 11.

En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 9. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO 9. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 12. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO 12. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO 9 y la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO 12.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende cero, uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos en cada una de las seis CDR, donde una o más de estas sustituciones es opcionalmente una sustitución conservadora y/o es una sustitución de un aminoácido codificado germinal.

Se presenta un resumen de las secuencias de las regiones variables y de las CDR para determinados anticuerpos anti-MASP-2 descritos en el presente documento en las TABLAS 1A, 1B y 1C a continuación. (“SIN” indica la SEQ ID NO)

TABLA 1A: Resumen de las secuencias de anticuerpos MASP-2

Anticuerpo	Región variable de	Cadena ligera	Región variable de	Cadena ligera

	cadena pesada (aa)	Región variable (aa)	cadena pesada (ADN)	Región variable (ADN)
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	SIN: 69	SIN: 72
OMS852	SIN: 46	SIN: 47	SIN: 75	SIN: 76
OMS854	SIN: 48	SIN: 47	SIN: 77	SIN: 76
OMS856	SIN: 49	SIN: 47	SIN: 78	SIN: 76
OMS858	SIN: 50	SIN: 47	SIN: 79	SIN: 76
OMS860	SIN: 8	SIN: 11	SIN: 70	SIN: 73
OMS870	SIN: 9	SIN: 12	SIN: 71	SIN: 74

TABLA 1B: Resumen de las secuencias de anticuerpos inhibidores de alta afinidad de MASP-2 con CDR

Anticuerpo	Región variable de cadena pesada (aa)	Cadena ligera Región variable (aa)	Cadena pesada CDR1; CDR2; CDR3	Cadena ligera CDR1; CDR2; CDR3
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS860	SIN: 8	SIN: 11	14, 22, 18	39, 34, 36
OMS870	SIN 9	SIN 12	25, 27, 29	41, 43, 45

TABLA 1C: Resumen de MASP-2 anticuerpo OMS850 con versiones humanizadas y modificadas

Anticuerpo	Región variable de cadena pesada	Cadena ligera Región variable	Cadena pesada CDR1; CDR2;	Cadena ligera CDR1; CDR2; CDR3
-------------------	---	--	--	---

	(aa)	(aa)	CDR3	
OMS850	SIN: 7	SIN: 10	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS852	SIN: 46	SIN: 47	14, 16, 18	32, 34, 36
OMS854	SIN: 48	SIN: 47	14, 53, 18	32, 34, 36
OMS856	SIN: 49	SIN: 47	56, 53, 18	32, 34, 36
OMS858	SIN: 50	SIN: 47	57, 53, 18	32, 34, 36

En determinadas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento comprenden una o más mutaciones en la región Fc. Por ejemplo, la región Fc puede comprender una o más mutaciones que aumentan la estabilidad o la función efectora. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos S228P. En algunas realizaciones, la región Fc comprende una o más mutaciones que promueven las interacciones FcRn a un nivel de pH bajo.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento se unen al dominio de serina proteasa del gen humano MASP-2 con una afinidad menor a 0,2 nM, menor a 0,3 nM, menor a 0,4 nM, menor a 0,5 nM, menor a 0,6 nM, menor a 0,7 nM, menor a 0,8 nM, menor a 0,9 nM, menor a 1,0 nM, menor a 1,2 nM, menor a 1,4 nM, menor a 1,6 nM, menor a 1,8 nM, menor a 2,0 nM, menor a 2,5 nM, menor a 3,0 nM, menor a 3,5 nM, menor a 4,0 nM, menor a 4,5 nM, menor a 5,0 nM, menor a 5,5 nM, menor a 6,0 nM, menor a 6,5 nM, menor a 7,0 nM, menor a 7,5 nM, menor a 8,0 nM, menor a 8,5 nM, menor a 9,0 nM, menor a 9,5 nM, menor a 10,0 nM, menor a 12 nM, menor a 14 nM, menor a 16 nM, menor a 18 nM, menor a 20 nM, menor a 22 nM, menor a 24 nM, menor a 26 nM, menor a 28 nM, o menor a 30 nM.

En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento inhiben la vía de la lectina de activación complementaria. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento inhiben la vía de la lectina en sangre de mamíferos. En algunas realizaciones, la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución en el depósito de componentes complementarios en las células efectoras. En algunas realizaciones, la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución en el depósito C3b, C4 o MAC. En algunas realizaciones, la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución en el depósito de componentes complementarios bajo condiciones específicas de la vía de las lectinas. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento inhiben la vía de la lectina de activación complementaria en la sangre de mamíferos, pero no inhibe la vía clásica de la activación complementaria en sangre de mamíferos.

IV. Polinucleótidos, vectores y células hospedadoras

En otro aspecto, esta divulgación da a conocer polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno de este, o una porción de este (p. ej., una CDR, una VH, una VL, una cadena pesada o una cadena ligera). En determinadas realizaciones, el polinucleótido está optimizado por codones para su expresión en una célula hospedadora. Una vez que se conoce o identifica una secuencia codificante, la optimización por codones se puede realizar mediante técnicas y herramientas conocidas, como la herramienta GenScript® OptimumGene™ el ThermoFisher Scientific® GeneArt GeneOptimizer™. Las secuencias optimizadas por codones incluyen secuencias parcialmente optimizadas por codones con uno o más codones optimizados de expresión en la célula hospedadora y aquellas completamente optimizadas por codones. También se valorará que los anticuerpos codificantes de polinucleótidos y los

fragmentos de unión a antígeno de estos posean diferentes secuencias de nucleótidos mientras que codifican la misma proteína debido a la redundancia del código genético, empalme, etc.

En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende un polinucleótido con al menos una identidad de al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o 100% a uno o más de las SEQ ID NO 69 a 79.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido codificante de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este puede estar comprendido en un polinucleótido que incluya otras secuencias y/o características. Por ejemplo, un polinucleótido puede incluir una o más secuencias útiles para el control o la expresión de proteínas codificantes, tales como secuencias de un promotor, secuencias de poliadenilación, secuencias codificantes de péptidos señalizadores, etc. El polinucleótido puede comprender ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN).

También se presentan vectores que comprenden o contienen un polinucleótido que codifica a cualquiera de los anticuerpos divulgados aquí o fragmentos de unión a antígeno de estos. Se puede usar cualquier vector apropiado, incluidos los vectores virales o los plásmidos. En determinadas realizaciones, un vector comprende un polinucleótido que codifica tanto una cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este y una cadena ligera del anticuerpo de un fragmento de unión a antígeno de este que juntos forman un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno de este. Las secuencias codificantes de la cadena pesada del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este y la cadena ligera del anticuerpo del fragmento de unión a

antígeno de este pueden estar contenidas dentro de un mismo marco abierto de lectura, en cuyo caso pueden estar opcionalmente separados por un polinucleótido codificante de un sitio de escisión de proteasa y/o un polinucleótido codificante de un péptido de autoescisión. Alternativamente, las secuencias que codifican la cadena pesada del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este y la cadena ligera del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este pueden estar contenidas dentro de marcos abiertos de lectura separados en un único vector. En otras realizaciones, las secuencias codificantes de la cadena pesada del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este y la cadena ligera del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este están presentes en dos vectores diferentes, de manera tal que un primer vector codifica a la cadena pesada del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este y un segundo vector codifica a la cadena ligera del anticuerpo del fragmento de unión a antígeno de este.

En otros aspectos, la presente divulgación da a conocer además una célula hospedadora que comprende un polinucleótido o un vector divulgado en el presente documento. También se puede utilizar una célula apropiada donde introducir ese polinucleótido o vector. Algunos ejemplos de esas células son: las eucariotas, incluidas las células de levadura, células de animales, de insectos, de mamíferos, de plantas, procarióticas, incluidas las bacterianas tales como la E. coli. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamíferos. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una línea celular inmortalizada de mamíferos. Las células apropiadas para su uso en la producción y expresión de polinucleótidos y vectores son bien conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, se puede transfectar a la célula con un polinucleótido o vector divulgado en el presente documento. El término “transfección” abarca cualquier método conocido como una de las capacidades de la técnica por

introducir moléculas de ácido nucleico en las células. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, lipofección, transfección con base en nanopartículas, transfección con base en virus, etc. Las células hospedadoras son transfectadas de manera estable y temporalmente.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora expresa el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este codificada por el polinucleótido o vector. Dicha expresión puede incluir modificaciones posteriores a la traducción como la eliminación de la secuencia señalizadora, glucosilación o las demás modificaciones. En un aspecto relacionado, la presente divulgación da a conocer métodos para producir los anticuerpos provistos y los fragmentos de unión a antígeno de estos, los que comprenden el cultivo de una célula hospedadora durante un tiempo suficiente bajo condiciones que permitan la expresión de anticuerpos o de fragmentos de unión a antígeno de estos y aislar los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de estos. Los métodos útiles para aislar y purificar las proteínas producidas de manera recombinante, incluyen, por ejemplo, obtener sobrenadante a partir de células hospedadoras adecuadas que segregan proteínas al medio de cultivo, concentrar el medio y purificar la proteína al pasar el concentrado a través de una matriz de purificación adecuada o una serie de matrices. Los métodos de purificación de proteínas son bien conocidos en la técnica.

V. Composiciones farmacéuticas

También se dan a conocer en el presente documento composiciones que comprenden un agente terapéutico seleccionado a partir de uno o más de los anticuerpos divulgados en el presente documento o los fragmentos de unión a antígeno de estos, polinucleótidos, vectores o células hospedadoras, independientes o combinadas y que también pueden incluir otros agentes

terapéuticos seleccionados. Dichas composiciones pueden comprender uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable es no tóxico, biocompatible y se selecciona para no afectar de manera adversa la actividad biológica del agente terapéutico (y de cualquier otro agente terapéutico combinado con ese). Ejemplos de transportadores farmacéuticamente aceptables de péptidos se describen en la Patente de EE. UU. n.º 5,211,657 a Yamada. Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento se pueden formular en preparaciones sólidas, semisólidas, en gel, líquidas o en formas gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, granulados, pomadas, soluciones, depósitos, inhaladores e inyecciones que permitan la administración oral, parenteral o quirúrgica. También se contempla la administración local de las composiciones mediante dispositivos médicos recubiertos y similares.

Los vehículos adecuados de administración parenteral por medio de inyectables, infusión o irrigación y la administración tópica incluyen agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológico, solución de Ringer lactato o normal, solución de glucosa, solución Hank o propanodiol. Además, los aceites estériles fijos pueden emplearse como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite biocompatible, incluidos los monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos, tal como el ácido oleico, se utilizan en la preparación de los inyectables. El vehículo y agente pueden formularse farmacéuticamente como líquido, suspensión, gel polimerizable o no polimerizable, pasta o bálsamo.

El vehículo también puede comprender un vehículo de administración para sostener (es decir, extender, prolongar o regular) la administración de los agentes o aumentar la administración, ingesta, estabilidad o farmacocinética de los agentes terapéuticos. Dicho vehículo de administración puede incluir, a título

de ejemplo, micropartículas, microesferas, nanoesferas o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, compuestos inorgánicos, hidrogeles polímeros o copolímeros y micelas poliméricas. Los sistemas adecuados de administración de hidrogel y micela incluyen los copolímeros PEO:PHB:PEO y los complejos de ciclodextrinas divulgados en WO 2004/009664 A2 y el PEO y los complejos PEO/ciclodextrina divulgados en la Publicación de la solicitud de patente n.º 2002/0019369 A1. Dichos hidrogeles se pueden inyectar de manera local en el lugar de la acción deseada o subcutánea o intramuscular para alcanzar una liberación sostenida y prolongada.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular para administración mediante cualquier método apropiado, incluido, entre otros, oral, tópico, transdérmico, sublingual, bucal, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarterial o en forma de inhalador.

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

Las composiciones farmacéuticas según determinadas realizaciones de la presente invención se formulan como para permitir que los ingredientes activos allí contenidos estén biodisponibles ante la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administren a un sujeto pueden tomar la forma de una o más unidades de dosis, y un contenedor de un agente terapéutico descrito en el presente documento puede contener una pluralidad de unidades de dosis. Los métodos reales para preparar tales formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition

(Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición por administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad eficaz de agente terapéutico o una composición de la presente divulgación, para tratamiento de una enfermedad o afección de interés de conformidad con las enseñanzas del presente documento.

Una composición farmacéutica puede ser sólida o líquida. En algunas realizaciones, el transportador es particulado para que las composiciones sean, por ejemplo, en comprimidos o en forma de polvo. El vehículo puede ser líquido, con las composiciones siendo por ejemplo, un aceite oral, líquido inyectable o un aerosol, que sirve, por ejemplo, en la administración por inhalación. Cuando se destina para administración oral, la composición farmacéutica es preferentemente sólida o líquida, donde se incluyen formas semisólidas, semilíquidas, suspensiones y geles dentro de las formas consideradas en el presente documento como sólidas o líquidas.

Como una composición sólida para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en polvo, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, chicle, obleas o similar. Dicha composición sólida contendrá generalmente uno o más de materiales de relleno inerte o diluyentes tales como sacarosa, maicena o celulosa. Además, también puede haber uno o más de: aglutinantes tales como la carboximetilcelulosa, celulosa de etilo, celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina, excipientes tales como el almidón, lactosa o dextrinas, agentes desintegrantes tales como el ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz entre otros; lubricantes como el estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como el dióxido de sílica coloidal, agentes endulzantes tales como la sacarosa o sacarina; un agente saborizante tales como la menta, salicilato de metilo o saborizante a naranja; y un agente colorante. Cuando la composición es en forma de cápsula, por ejemplo, una

cápsula de gelatina puede contener, además de los materiales mencionados arriba, un transportador líquido tal como el polietilenglicol o el aceite.

La composición puede ser en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o inyectable, como en el caso de dos ejemplos. Cuando es para administración oral, las composiciones preferenciales contienen, además de estos compuestos, uno o más de un agente endulzante, conservante, tintura/colorante y optimizador del sabor. En una composición para ser administrada por inyección, en general se incluye uno o más de un tensioactivo, conservante, humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden incluir uno o más de los siguientes excipientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijados tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de muchas dosis elaborados de vidrio o plástico. Se prefiere la solución fisiológica como excipiente. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

Una composición líquida destinada a la administración parenteral u oral debe contener una cantidad de un agente terapéutico como se describe en el presente documento de manera que se obtenga una dosificación adecuada. El término

“parenteral” incluye inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal o intraarterial. Normalmente, el agente terapéutico es al menos el 0,01% de la composición. Cuando se pretende para la administración oral, esta cantidad puede variar entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 70% en peso de la composición. Determinadas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente un 4% y aproximadamente un 75% del agente terapéutico.

La composición puede estar destinada a la administración tópica, en cuyo caso el transportador puede comprender adecuadamente una base de solución, emulsión, ungüento o gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Los agentes espesantes pueden estar presentes en una composición para administración tópica. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. La composición farmacéutica puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se disolverá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

Una composición puede incluir varios materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una cubierta de revestimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento son normalmente inertes y pueden seleccionarse, por ejemplo, entre azúcar, goma laca y otros agentes de revestimiento entérico. Alternativamente, los ingredientes activos pueden encerrarse en una cápsula de gelatina. La composición en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une a los agentes terapéuticos de

la divulgación y, por lo tanto, ayuda en la administración del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar en esta capacidad incluyen una o más proteínas o un liposoma.

La composición puede consistir esencialmente en unidades de dosificación que pueden administrarse en forma de aerosol. El término aerosol se usa para denotar una o más de una serie de sistemas que van desde aquellos de naturaleza coloidal hasta sistemas que consisten en paquetes presurizados. El suministro puede ser por un gas licuado o comprimido o por un sistema de bomba adecuado que dispensa los ingredientes activos. Los aerosoles pueden administrarse en un sistema monofásico, bifásico o trifásico para administrar los principios activos. El suministro del aerosol incluye el contenedor, los activadores, las válvulas, los subcontenedores y similares necesarios, que juntos pueden formar un kit. Un experto normal en la técnica, sin excesiva experimentación, puede determinar los aerosoles preferidos.

Se entenderá que las composiciones de la presente divulgación también abarcan moléculas transportadoras para polinucleótidos, como se describe en el presente documento (p. ej., nanopartículas lipídicas, plataformas de administración a nanoescala y similares).

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante una metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición destinada a ser administrada por inyección se puede preparar combinando una composición que comprende un agente terapéutico como se describe en el presente documento y, opcionalmente, una o más sales, tampones y/o estabilizadores, con agua destilada estéril para formar una solución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que

interactúan de forma no covalente con la composición para facilitar la disolución o suspensión homogénea en el sistema de suministro acuoso.

VI. Métodos y usos

Además, en el presente documento se proporcionan métodos para el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, ácido nucleico, vector, célula o composición de la presente divulgación para activar la vía de la lectina del complemento en un sujeto mamífero. En algunas realizaciones, el método comprende administrar a un sujeto mamífero que lo necesite una cantidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, ácido nucleico, vector, célula o composición de la presente divulgación suficiente para inhibir la vía de la lectina de la activación del complemento en el mamífero. En algunas realizaciones, el método puede comprender además, antes de administrar un compuesto de la divulgación al sujeto, determinar que el sujeto padece una enfermedad o trastorno de la vía de la lectina. En algunas realizaciones, el sujeto mamífero es un ser humano.

En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, ácido nucleico, vector, célula o composición de la presente divulgación para su uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno de la vía de la lectina. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, ácido nucleico, vector, célula o composición de la presente divulgación para su uso en un método de fabricación o preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno de la vía de la lectina.

Como se describe en las patentes de los EE. UU. n.º 7,919,094; 8,840,893; 8,652,477; 8,951,522, 9,011,860, 9,475,885, 9,644,035, n.º de publicación de solicitud de patente US2013/0344073, US2013/0266560, US 2015/0166675, US2017/0137537, US2017/0166660, US2017/0189525, US2017/0267781,

US2017/0283508, US2017/0253667, US2018/0105604, WO2018/045054, WO2018/071701, WO2019/036460, WO2019/246,367, WO2021/178902 y n.º de serie de solicitud de patente de EE. UU. pendiente de aprobación 17/103,672 (cada una de las cuales está cedida a Omeros Corporation, el cesionario de la presente solicitud, y cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia), se ha implicado que la activación del complemento dependiente de MASP-2 contribuye a la patogenia de numerosos estados patológicos agudos y crónicos. Por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8,951,522, la función principal del sistema del complemento es proteger al hospedador contra agentes infecciosos; sin embargo, la activación inadecuada o excesiva del sistema del complemento puede provocar enfermedades graves, como microangiopatías trombóticas (TMA, incluidos aHUS, TTP y HUS) en el que el daño endotelial, así como el depósito de fibrina y los trombos ricos en plaquetas en la microvasculatura conducen al daño de los órganos. La vía de la lectina juega un papel dominante en la activación del complemento en entornos de estrés o lesión de las células endoteliales, y previene la activación de MASP-2 y la vía de la lectina detiene la secuencia de reacciones enzimáticas que conducen a la formación del complejo de ataque a la membrana, activación plaquetaria y reclutamiento de leucocitos. Como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8,652,477, además de iniciar la vía de la lectina, MASP-2 también activa el sistema de coagulación y es capaz de escindir la protrombina en trombina.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se selecciona del grupo que consiste en una microangiopatía trombótica (TMA), una afección renal, una reacción inflamatoria resultante del trasplante de tejido u órgano, una lesión por reperfusión de isquemia o una complicación asociada. diabetes, una complicación asociada con la hemodiálisis, una enfermedad o trastorno cardiovascular, un trastorno gastrointestinal inflamatorio, un trastorno pulmonar, una enfermedad o trastorno oftálmico,

coagulación intravascular diseminada, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad venooclusiva y hemorragia alveolar difusa.

En algunas realizaciones, se proporciona una terapia de combinación que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, ácidos nucleicos, vectores, células o composiciones de la presente divulgación y uno o más agentes terapéuticos adicionales. Se apreciará que en dicha terapia de combinación, el uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, ácido nucleico, vector, célula o composición de la presente divulgación y uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en cualquier orden y cualquier secuencia, en cualquier intervalo de tiempo o al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una microangiopatía trombótica (TMA) que incluye púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), TTP refractaria, síndrome de Upshaw-Schulman (USS), síndrome urémico hemolítico (HUS) y síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), síndrome hemolítico atípico no dependiente del factor H, aHUS secundario a una infección, aHUS resistente a la terapia con plasma, una TMA secundaria a un cáncer, una TMA secundaria a quimioterapia u otra terapia contra el cáncer, una TMA secundaria a un trasplante, o una TMA asociada a un trasplante de células madre hematopoyéticas, una TMA secundaria a una infección y una vasculitis IgA.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que incluye la GVHD aguda, la GVHD crónica o la GVHD resistente a los esteroides. En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar GVHD se ha sometido previamente, se está sometiendo o se someterá a un trasplante de células madre hematopoyéticas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es hemorragia alveolar difusa (DAH). En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar DAH se ha sometido previamente, se está sometiendo o se someterá a un trasplante de células madre hematopoyéticas. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es el síndrome de fuga capilar, el síndrome de injerto, la sobrecarga de líquidos o el síndrome de neumonía idiopática. En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar una o más de estas enfermedades o trastornos ha sufrido previamente, está sufriendo o sufrirá un trasplante de células madre hematopoyéticas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una enfermedad venooclusiva (VOD). En algunas realizaciones, el sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar VOD se ha sometido previamente, se está sometiendo o se someterá a un trasplante de células madre hematopoyéticas. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un síntoma neurológico asociado con la enfermedad de injerto contra huésped o TMA, como astenia, parestesias, tetraplejia, déficit sensitivomotor, polineuropatía disautonómica o vejiga neurógena.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una afección renal que incluye, entre otros, glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa (glomerulonefritis mesangiocapilar), glomerulonefritis postinfecciosa aguda (glomerulonefritis posestreptocócica), glomerulopatía C3, glomerulonefritis crioglobulinémica, glomerulonefritis necrotizante pauciinmune, nefritis lúpica, nefritis por púrpura de Henoch-Schonlein y nefropatía IgA.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es fibrosis renal (p. ej., fibrosis tubulointersticial) y/o proteinuria en un sujeto que

padece o tiene riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica, insuficiencia renal crónica, esclerodermia en el riñón (incluida la crisis renal esclerodérmica), enfermedad glomerular (p. ej., glomeruloesclerosis focal y segmentaria), un trastorno por complejos inmunitarios (p. ej., nefropatía por IgA, nefropatía membranosa), nefritis lúpica, síndrome nefrótico, nefropatía diabética, daño tubulointersticial y glomerulonefritis (p. ej., glomerulopatía C3), o una enfermedad o afección asociada con proteinuria, que incluye, entre otros, síndrome nefrótico, preeclampsia, eclampsia, lesiones tóxicas de los riñones, amiloidosis, enfermedades vasculares del colágeno (p. ej., lupus eritematoso sistémico), deshidratación, enfermedades glomerulares (p. ej., glomerulonefritis membranosa, nefropatía glomerular membranosa, glomerulonefritis focal y segmentaria, glomerulopatía C3, enfermedad de cambios mínimos, nefrosis lipoide), ejercicio extenuante, estrés, proteinuria ortostática benigna (postural), glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía IgA (es decir, enfermedad de Berger), nefropatía IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, enfermedad de cambios mínimos, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus (nefropatía diabética), toxicidad inducida por fármacos (p. ej., NSAIDS, nicotina, penicilamina, carbonato de litio, oro y otros metales pesados, inhibidores de la ACE, antibióticos [p. ej., adriamicina] u opiáceos [p. ej., heroína] u otras nefrotoxinas); enfermedad de Fabry, infecciones (p. ej., VIH, sífilis, hepatitis A, B o C, infección posestreptocócica, esquistosomiasis urinaria); aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefroesclerosis hipertensiva, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, rechazo de órganos (p. ej., rechazo de trasplante de riñón), fiebre hemorrágica del Ébola, síndrome de la uña rotuliana, fiebre mediterránea familiar, síndrome HELLP, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, artritis reumatoide, enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo 1, síndrome de Goodpasture, púrpura de Henoch-Schonlein, infección del tracto urinario que se ha extendido a los riñones, síndrome de Sjogren y glomerulonefritis post-infecciosa.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una reacción inflamatoria que resulta del trasplante de tejido o de órgano sólido que incluye, entre otros, alotrasplante o xenotrasplante de órganos completos (p. ej., riñón, corazón, hígado, páncreas, pulmón, córnea, etc.) o injertos de tejido (p. ej., válvulas, tendones, médula ósea, etc.). En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una función retrasada del injerto.

En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina es una lesión por reperfusión de isquemia (I/R), que incluye, entre otros, I/R miocárdica, I/R gastrointestinal, I/R renal y I/R después de la reparación de aneurisma aórtico, I/R asociada con derivación cardiopulmonar, I/R cerebral, accidente cerebrovascular, reanastomosis vascular en relación con trasplante de órganos y/o reinserción de extremidades o dedos amputados o traumatizados y/o procedimientos quirúrgicos.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una complicación asociada con la diabetes no obesa (diabetes tipo 1 o diabetes mellitus insulino dependiente) y/o complicaciones asociadas con la diabetes tipo 1 o tipo 2 (aparición en adultos) que incluye, entre otros, angiopatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía diabética o edema macular diabético.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una enfermedad o trastorno cardiovascular, que incluye, entre otros, nefritis púrpura de Henoch-Schonlein, vasculitis asociada al lupus eritematoso sistémico, vasculitis asociada con la artritis reumatoide (también llamada artritis reumatoide maligna), vasculitis por complejos inmunitarios, vasculitis asociada a autoanticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), enfermedad de Takayasu, miocardiopatía dilatada, angiopatía diabética, enfermedad de Kawasaki (arteritis), embolia gaseosa venosa (VGE) e inhibición de la

reestenosis después de la colocación de stent, aterectomía rotacional y/o angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un trastorno gastrointestinal inflamatorio, que incluye, entre otros, pancreatitis, diverticulitis y trastornos intestinales, incluida la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina es causado o exacerbado por la fibrosis del tracto digestivo. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es fibrosis pancreática.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un trastorno pulmonar, que incluye, entre otros, síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar aguda relacionada con transfusiones, lesión pulmonar aguda por isquemia/reperfusión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, granulomatosis de Wegener, enfermedad de la membrana basal antiglomerular (enfermedad de Goodpasture), síndrome de aspiración de meconio, neumonía por aspiración, síndrome de bronquiolitis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, lesión pulmonar aguda secundaria a quemadura, edema pulmonar no cardiogénico, depresión respiratoria relacionada con transfusiones y enfisema.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una reacción inflamatoria desencadenada por exposición extracorpórea y el método comprende tratar a un sujeto que se somete a un procedimiento de circulación extracorpórea que incluye, entre otros, hemodiálisis, plasmaféresis, leucoféresis, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), precipitación de LDL de oxigenación por membrana extracorpórea inducida por heparina (HELP) y derivación cardiopulmonar (CPB).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se selecciona de artritis inflamatoria o no inflamatoria y otros trastornos musculoesqueléticos, incluidos, entre otros, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, gota, artropatía neuropática, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante u otras espondiloartropatías y artropatías cristalinas, distrofia muscular y lupus eritematoso sistémico (SLE).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un trastorno de la piel que incluye, entre otros, psoriasis, dermatosis ampollosas autoinmunitarias, espongiosis eosinofílica, penfigoide ampolloso, epidermólisis ampollosa adquirida, dermatitis atópica, herpes gestacional y otros trastornos de la piel, y para el tratamiento de quemaduras térmicas y químicas, incluidas las fugas capilares causadas por ellas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un trastorno o lesión del sistema nervioso periférico (PNS) y/o del sistema nervioso central (CNS) que incluye, entre otros, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG); enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), síndrome de Guillain Barre, reperusión después de un accidente cerebrovascular, discos degenerativos, traumatismo cerebral, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Miller-Fisher, traumatismo y/o hemorragia cerebral, lesión cerebral traumática, fibrosis del CNS, desmielinización y meningitis.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es sepsis o una afección resultante de sepsis que incluye, entre otros, sepsis grave, shock séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda resultante de sepsis, anemia hemolítica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o shock hemorrágico.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un trastorno urogenital que incluye, entre otros, enfermedad vesical dolorosa, enfermedad vesical sensorial, cistitis abacteriana crónica y cistitis intersticial, infertilidad masculina y femenina, disfunción placentaria y aborto espontáneo y preeclampsia.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una reacción inflamatoria en un sujeto que está siendo tratado con quimioterapia y/o radioterapia, que incluye, entre otros, el tratamiento de afecciones cancerosas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un cáncer dependiente de la angiogénesis, que incluye, entre otros, tumores sólidos, tumores transmitidos por la sangre, tumores carcinoides de alto riesgo y metástasis tumorales. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es un tumor benigno dependiente de la angiogénesis, que incluye, entre otros, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias, tumores carcinoides y granulomas piógenos.

En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina es un trastorno endocrino que incluye, entre otros, la tiroiditis de Hashimoto, el estrés, la ansiedad y otros posibles trastornos hormonales que implican la liberación regulada de prolactina, el factor de crecimiento o el factor de crecimiento similar a la insulina y la adrenocorticotropina desde la hipófisis.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una enfermedad o trastorno oftálmico que incluye, pero no se limita a, la degeneración macular relacionada con la edad, el glaucoma y la endoftalmitis. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una enfermedad o afección angiogénica ocular que incluye, pero no se limita a la

degeneración macular asociada a la edad, la uveítis, el melanoma ocular, la neovascularización corneal, el pterigión primario, la queratitis estromal por HSV, la linfangiogénesis corneal inducida por HSV, retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético, retinopatía del prematuro, oclusión venosa de la retina, rechazo del injerto corneal, glaucoma neovascular, hemorragia vítrea secundaria a retinopatía diabética proliferativa, neuromielitis óptica, catarata subcapsular anterior, opacificación de la cápsula posterior y rubeosis.

En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina es la coagulación intravascular diseminada (DIC) u otro trastorno de la coagulación mediado por el complemento, incluida la DIC secundaria a la sepsis, el traumatismo grave, incluido el traumatismo neurológico (por ejemplo, traumatismo craneal agudo, véase Kumura *et al.*, Acta Neurochirurgica 55:23-28 (1987), infección (bacteriana, vírica, fúngica, parasitaria), cáncer, complicaciones obstétricas, enfermedad hepática, reacción tóxica grave (por ejemplo, mordedura de serpiente, picadura de insecto, reacción a una transfusión), shock, golpe de calor, rechazo de trasplante, aneurisma vascular, insuficiencia hepática, tratamiento del cáncer mediante quimioterapia o radioterapia, quemadura o exposición accidental a la radiación.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se selecciona del grupo que consiste en el síndrome de radiación aguda, la enfermedad de depósitos densos, la enfermedad de Degos, el síndrome antifosfolípido catastrófico (CAPS), la enfermedad de Behcet, la crioglobulinemia; la hemoglobinuria paroxística nocturna ("PNH") y la enfermedad de la aglutinina fría.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se selecciona del grupo que consiste en aHUS, HSCT-TMA, IgAN y nefritis lúpica (LN).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se asocia con la activación inducida por la fibrina del sistema del complemento y la activación asociada de los sistemas de coagulación y/o contacto. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina o la afección asociada con la inflamación relacionada con el complemento, la coagulación excesiva o la activación del sistema de contacto iniciada por la fibrina o las plaquetas activadas. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina se selecciona del grupo que consiste en trombosis arterial, trombosis venosa, trombosis venosa profunda, trombosis posquirúrgica, reestenosis tras un injerto de derivación de arteria coronaria y/o un procedimiento cardiovascular intervencionista (por ejemplo, angioplastia o colocación de un stent), aterosclerosis, rotura de la placa, inestabilidad de la placa, reestenosis, hipotensión, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), coagulación intravascular diseminada (DIC), enfermedad venooclusiva (VOD) microangiopatía trombótica, nefritis lúpica, tromboflebitis superficial, mutación del Factor V Leiden, lesión por isquemia/reperfusión, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), estar sometido a terapia de sustitución hormonal (HRT), enfermedad de Alzheimer y/o padecer un estado hipercoagulable. En algunas realizaciones, la vía de la lectina llega a un estado hipercoagulable adquirido debido a al menos uno o más de los siguientes: someterse a una terapia con un fármaco seleccionado del grupo que consiste en 5-FU, GM-CSF, cisplatino, heparina, inhibidor COX-2, medios de contraste, corticosteroides y antipsicóticos; estasis venosa (inmovilización, cirugía, etc.), síndrome antifosfolípido, cáncer (leucemia promielocítica, de pulmón, de mama, de próstata, de páncreas, de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de esófago, tumores de estómago y de colon), lesión tisular debida a un traumatismo o a una intervención quirúrgica, presencia de un catéter en una vena central, deficiencia adquirida de una proteína implicada en la formación de coágulos (por ejemplo proteína C), hemoglobinuria

paroxística nocturna (PNH), niveles elevados de homocisteína, insuficiencia cardíaca, presencia de una válvula mecánica, hipertensión pulmonar con trombosis *in situ*, fibrilación auricular, trombocitopenia inducida por heparina (HIT), trombocitopenia y trombosis inducidas por heparina (HITT), enfermedad de Kawasaki con trombo *in situ*, arteritis de Takayasu con trombo *in situ*, trombofilia de cáncer metastásico, niveles elevados de Factor VIII, embarazo, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), o debido a un defecto genético que cause o aumente el riesgo de desarrollar un estado hipercoagulable, como un defecto genético seleccionado del grupo que consiste en una mutación del gen de la protrombina 20210, una mutación de la MTHFR, una deficiencia de la proteína C, una deficiencia de la proteína S, una deficiencia de la proteína A, una deficiencia de la proteína Z, una deficiencia de antitrombina y un trastorno genético que produzca trombofilia.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la fibrosis mamaria, la fibrosis muscular, la fibrosis retroperitoneal, la fibrosis tiroidea, la fibrosis de los ganglios linfáticos, la fibrosis de la vejiga, la fibrosis cardíaca, la fibrosis hepática, la fibrosis articular, la fibrosis cutánea o la fibrosis pleural. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una fibrosis de las estructuras de los tejidos blandos musculoesqueléticos (por ejemplo, capsulitis adhesiva, contractura de Dupuytren, afecciones mielodisplásicas con aumento de la fibrosis ósea, osteoporosis, mielofibrosis u osteopenia asociada, por ejemplo, a la fibrosis quística). En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la fibrosis resultante de una infección viral, como una infección por el virus alfa, una infección por tuberculosis o una infección por gripe. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno de la vía de la lectina es una cicatrización asociada a un traumatismo, como las complicaciones quirúrgicas (por ejemplo, las adherencias quirúrgicas en las que se puede formar tejido cicatricial entre los órganos internos que provoca contractura, dolor y puede

causar infertilidad), la fibrosis inducida por fármacos quimioterapéuticos o la cicatrización asociada a las quemaduras. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la fibrosis de los órganos reproductores (por ejemplo, la endometriosis y la enfermedad de Peyronie).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es susceptible de tratamiento con un inhibidor de la calicreína. En algunas realizaciones, la vía de la lectina se selecciona del grupo que consiste en angioedema hereditario, edema macular diabético y hemorragia durante la derivación cardiopulmonar. En algunas realizaciones, la vía de la lectina es susceptible de tratamiento con un inhibidor de la trombina, como la trombosis arterial, la trombosis venosa, la embolia pulmonar, la fibrilación auricular, la trombocitopenia inducida por la heparina, la conversión de un anticoagulante a otro, o el uso fuera de etiqueta para la permeabilidad del circuito extracorpóreo de la terapia de sustitución renal continua (CRRT) en pacientes críticos con HIT (mantenimiento).

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina que es susceptible de tratamiento con un inhibidor del factor XII, como la trombosis venosa profunda (tanto la profilaxis primaria como la terapia prolongada), la embolia pulmonar, la fibrilación auricular no valvular, la prevención de la isquemia recurrente después del síndrome coronario agudo en sujetos con o sin fibrilación auricular, la enfermedad renal terminal, la isquemia cerebral, la angina de pecho, o para reducir o prevenir la coagulación asociada a los dispositivos médicos (p. ej. g., válvulas, injertos de pequeño calibre, etc.) y/o circuitos extracorpóreos.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una enfermedad o trastorno adquirido que aumenta la propensión al tromboembolismo, como una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo

que consiste en aterosclerosis, anticuerpos antifosfolípidos, cáncer (por ejemplo, leucemia promielocítica, pulmón, mama, próstata, páncreas, estómago y colon), hiperhomocisteinemia, infección, lesión tisular, estasis venosa (como la debida a cirugía, inmovilización ortopédica o paralítica, insuficiencia cardíaca, embarazo u obesidad) y un sujeto que toma anticonceptivos orales que contienen estrógenos. En algunas realizaciones, el sujeto necesita una terapia anticoagulante y los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos, los polinucleótidos, los vectores, las células hospedadoras y/o las composiciones descritas en el presente documento se utilizan en sustitución de la terapia anticoagulante estándar (por ejemplo, Warfarina). En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección que normalmente prohíbe la terapia anticoagulante estándar, como la angiopatía amiloide del CNS. En algunas realizaciones del método, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de estos, los polinucleótidos, los vectores, las células hospedadoras y/o las composiciones descritas en el presente documento se administran como agente puente perioperatorio en un sujeto que, por lo demás, recibe un tratamiento anticoagulante estándar. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la anemia de células falciformes, que es un trastorno vasooclusivo que implica la activación de las plaquetas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es la infección por SARS-CoV-2. La infección por el SARS-CoV-2 puede dar lugar a enfermedades o trastornos de la vía de la lectina por varios mecanismos diferentes. Además de la infección aguda o crónica por el SARS-CoV-2, la infección pasada o presente por el SARS-CoV-2 puede desencadenar otras afecciones crónicas. Las enfermedades de la vía de la lectina o los trastornos relacionados con la infección por el SARS-CoV-2 pueden surgir por la interacción directa de la MASP-2 con las proteínas víricas, como la unión de la MASP-2 al SARS-CoV-2. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno de la vía de la lectina puede surgir a través de la unión de MASP-2 a la proteína S o N del SARS-CoV-

2. Alternativamente, algunas enfermedades o trastornos de la vía de la lectina pueden surgir tras la interacción de las moléculas de reconocimiento de la vía de la lectina con las glicoproteínas virales presentes en la superficie viral o en la superficie de las células infectadas por el virus. Además, las enfermedades o trastornos de la vía de la lectina pueden ser el resultado de la activación de la vía de la lectina por los DAMP presentados por las células infectadas por el SARS-CoV-2. En algunas realizaciones, la infección por SARS-CoV-2 es una infección aguda. En algunas realizaciones, la infección por SARS-CoV-2 es una infección crónica. En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es una afección crónica en curso causada por una infección pasada de SARS-CoV-2. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es síndrome de dificultad respiratoria aguda. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno de la vía de la lectina es secundaria a la infección por SARS-CoV-2. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de estos divulgados en el presente documento bloquean la unión de MASP-2 a la proteína S y/o la proteína N del SARS-CoV-2.

A continuación, se describen con más detalle algunos ejemplos de enfermedades y trastornos de la vía de la lectina.

Síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS).

El síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) forma parte de un grupo de enfermedades denominadas "microangiopatías trombóticas". En la forma atípica del SHU (aHUS), la enfermedad está asociada a una regulación defectuosa del complemento y puede ser esporádica o familiar. Los casos familiares de aHUS se asocian a mutaciones en los genes que codifican la activación del complemento o las proteínas reguladoras del complemento, que incluye el factor H del complemento, el factor I, el factor B, el inhibidor de la proteína cofactor de

membrana (CD46), así como la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento (CFHR1) y la proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (CFHR3). (Zipfel, P.F., *et al.*, PloS Genetics 3(3):e41 (2007)). La característica unificadora de este diverso conjunto de mutaciones genéticas asociadas al aHUS es la predisposición a una mayor activación del complemento en las superficies celulares o tisulares. Un sujeto está en riesgo de desarrollar SHU a partir de la aparición de al menos uno o más síntomas indicativos de SHU a (por ejemplo, la presencia de anemia, trombocitopenia y/o insuficiencia renal) y/o la presencia de microangiopatía trombótica en una biopsia obtenida del sujeto. La determinación de si un sujeto está en riesgo de desarrollar el aHUS comprende la determinación de si el sujeto tiene una predisposición genética a desarrollar el aHUS, que puede llevarse a cabo mediante la evaluación de la información genética (por ejemplo, a partir de una base de datos que contenga el genotipo del sujeto), o la realización de al menos una prueba de cribado genético en el sujeto para determinar la presencia o ausencia de un marcador genético asociado con el aHUS (es decir, determinar la presencia o ausencia de una mutación genética asociada al aHUS en los genes que codifican el factor H del complemento (CFH), el factor I (CFI), el factor B (CFB), el inhibidor de la proteína cofactora de membrana (CD46), el C3, la proteína 1 relacionada con el factor H del complemento (CFHR1), o la THBD (que codifica la proteína anticoagulante trombomodulina) o la proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (CFHR3), o la proteína 4 relacionada con el factor H del complemento (CFHR4)), ya sea mediante la secuenciación del genoma o un análisis específico de genes (p. ej. g., análisis de PCR), y/o determinando si el sujeto tiene antecedentes familiares de aHUS. Los métodos de cribado genético para detectar la presencia o ausencia de una mutación genética asociada al aHUS están bien establecidos, por ejemplo, véase Noris M *et al.* "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome," 2007 Nov 16 [Updated 2011 Mar 10]. En: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, *et al.*, editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

TMA asociada al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT-TMA)

La TMA asociada al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT-TMA) es una complicación potencialmente mortal que se desencadena por una lesión endotelial. El riñón es el órgano más comúnmente afectado, aunque la HSCT-TMA puede ser una enfermedad multisistémica que también afecta al pulmón, el intestino, el corazón y el cerebro. La aparición de la TMA, incluso la más leve, se asocia a un deterioro renal a largo plazo. El desarrollo de la TMA asociada al HSCT posalogénico difiere en frecuencia en función de los distintos criterios de diagnóstico y de los regímenes de acondicionamiento y profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped, siendo los inhibidores de la calcineurina los fármacos más frecuentemente implicados (Ho VT *et al.*, Biol Blood Marrow Transplant, 1(8):571-5, 2005).

Nefropatía por inmunoglobulina A (IgAN)

La nefropatía por inmunoglobulina A (IgAN) es una enfermedad renal autoinmunitaria que provoca una inflamación intrarrenal y una lesión renal. La IgAN es la enfermedad glomerular primaria más común a nivel mundial. Con una incidencia anual de aproximadamente 2,5 por cada 100.000, se estima que 1 de cada 1400 personas en EE.UU. desarrollará la IgAN. Hasta el 40% de los pacientes con IgAN desarrollarán una enfermedad renal terminal (ESRD). Los pacientes suelen presentar hematuria microscópica con proteinuria de leve a moderada y niveles variables de insuficiencia renal (Wyatt R.J., *et al.*, NEngl J Med 36S(25):2402-4, 2013). Los marcadores clínicos como el deterioro de la función renal, la hipertensión sostenida y la proteinuria intensa (más de 1 g al día) se asocian a un mal pronóstico (Goto M *et al.*, Nephrol Dial Transplant 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. *et al.*, J Am Soc Nephrol 22(4):752-61, 2011). La proteinuria es el factor pronóstico más importante, independientemente de

otros factores de riesgo, en múltiples estudios observacionales de gran tamaño y ensayos prospectivos (Coppo R. *et al.*, J Nephrol 18(5):503-12, 2005; Reich H. N., *et al.*, J Am Soc Nephrol 18(12):3177-83, 2007). Se calcula que entre el 15% y el 20% de los pacientes alcanzan la insuficiencia renal terminal en los 10 años siguientes a la aparición de la enfermedad si no reciben tratamiento (D'Amico G., Am J Kidney Dis 36(2):227-37, 2000). El sello diagnóstico de la IgAN es el predominio de los depósitos de IgA, solos o con IgG, IgM o ambos, en el mesangio glomerular.

Nefritis lúpica (NL)

Una de las principales complicaciones del lupus eritematoso sistémico (SLE) es la nefritis, también conocida como nefritis lúpica, que se clasifica como una forma secundaria de glomerulonefritis. Hasta el 60% de los adultos con LES tienen alguna forma de afectación renal más adelante en el curso de la enfermedad (Koda-Kimble *et al.*, Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs, 10th Ed, Lippincott Williams & Wilkins: pages 792-9, 2012) con una prevalencia de 20-70 por cada 100.000 personas en EE.UU. La nefritis lúpica suele presentarse en pacientes con otros síntomas de LES activo, como fatiga, fiebre, erupción cutánea, artritis, serositis o enfermedad del sistema nervioso central (Pisetsky D.S. *et al.*, Med Clin North Am 81(1): 113-28, 1997). Algunos pacientes tienen nefritis lúpica asintomática; sin embargo, durante el seguimiento periódico, las anomalías de laboratorio, como niveles elevados de creatinina sérica, niveles bajos de albúmina o proteínas o sedimentos en la orina, sugieren una nefritis lúpica activa.

VI. Secuencias

Las secuencias a las que se refiere la presente memoria se resumen en la TABLA 2.

TABLA 2

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	MASP-2 humana	MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPG FPGEYANDQERRWTLTAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPG KDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF EAFYAAE DIDECQVAPGEAPTCDDHHCHNHLGGFYCSCRAG YVLHRNKRTCSALCSGQVFTQRSGELSSPEYPRP YPKLSSCTYSISLEEGFSVILDFVESFDVETHPETL CPYDFLKIQT DREEHGPF CGKTLPHRIETKSNTVTI TFVTDES GDHTGWKIH YTSTAQPCPYPMAPPNGH VSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGH LPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPAC SIVDCGPPDDLPSGRVEYI TGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEA DGFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGG QKAKPGDFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTAA HAVYEQKH DASALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEA VFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINSNITPICL PRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLARNLMY VDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLE SGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWFVGGIVSW GSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF
2	MASP-2 de ratón	MRLLI FLGLLWSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGF PEKYADHQDRSWTLTAPPGYRLRLYFTHFDLELS YRCEYDFVKLSSG TKVLATLCGQESTDTEQAPGN

		DTFYSLGPSLKVTFHSDYSNEKPFTGFEAFYAAED VDECRVSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCRAGY VLHQNKHTCSALCSGQVFTGRSGYLSSPEYPQPY PKLSSCTYSIRLEDGFSVILDFVESFDVETHPEAQC PYDSLKIQTDKGEHGPF CGKTLPPRIETDSHKVTIT FATDESGNHTGWKIHYTSTARPCPDPTAPPNGSI SPVQAIYVLKDRFSVFCKTGFE LLQGSVPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPECSIIDCGPPDDL PNGHVDYI TGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEAD GFWTSSKGEKLPPVCEPVCGLSTHTIGGRIVGGQ PAKPGDFPWQVLLL GQTTAAAGALIH DNWVLTAA HAVYEKRMAASSLNIRMGILKRLSPHYTQAWPEEI FIHEGYTHGAGFDNDIALIKLKNKVTINGSIMPVCLP RKEAASLMRTDFTGT VAGWG LTQKGLLARNLMFV DIPIADHQKCTAVYEKLYPGVRVSANMLCAGLETG GKDSCRGDSSGALVFLDNETQRWFVGGIVSWGS INCGAADQYGVYTKVINYIPWIENIISNF
3	MASP-2 de rata	MRL LIVLGLLSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGF PEKYGNHQDRSWTLTAPPGFRLRLYFTHFNLELS YRCEYDFVKLTSGTKVLATLCGQESTDTERAPGN DTFYSLGPSLKVTFHSDYSNEKPFTGFEAFYAAED VDECRTSLGDSVPCDHYCHNYLGGYYCSCR VGYI LHQNKHTCSALCSGQVFTGRSGFLSSPEYPQPYP KLSSCAYNIRLEEGFSITLDFVESFDVEMHPEAQC PYDSLKIQTDKREYGPFCGKTLPPRIETDSNKVTIT FTTDESGNHTGWKIHYTSTAQPCPDPTAPPNGHI SPVQATYVLKDSFSVFCKTGFE LLQGSVPLKSFTA VCQKDGSWDRPIPECSIIDCGPPDDL PNGHVDYIT GPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADG

		FWTSSKGEKSLPVCKPVCGLSTHTSGGRIIGGQP AKPGDFPWQVLLLGETTAAGALIHDDWVLTAAHA VYGKTEAMSSLDIRMGILKRLSPHYTQAWPEAVFI HEGYTHGAGFDNDIALIKLKNKVTINRNIMPICLPR KEAASLMKTDFVGTVAGWGLTQKGFLARNLMFV DIPIVDHQKCATAYTKQPYPGAQKVTNMLCAGLDA GGKDSCRGDSSGALVFLDNETQRWFGGIVSWG SINCGGSEQYGVYTKVTNYIPWIENIINNF
4	MASP-2 de macaco cangrejero	MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPG FPGEYANDQERRWTLTAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGHESTDTERAPG NDTFYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGFEAFYAAE DIDECQVAPGEAPACDHHCHNHLGGFYCSCRVG YILHRNKRTCSALCSGQVFTQSRGELSSPEYPQP YPKLSSCTYSIRLEEGFSVILDFVESFDVETHPETL CPYDFLKIQIDSEEHGPF CGKTLPRRIETKSNTVTI TFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGH LSPVQAKYILKDSFSIFCEPGYELLQGHLPKLSFAA VCQKDGSWDQPMPCSVDCGPPDDLPSGRVEY ITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEA DGFWTSSKGERSPPVCEPVCGLSARTTGRIYG GQKAKPGDFPWQVLILGGSTAAGALLYDNWVLT AHAIYEQKHDASSLDIRLGALKRLSPHYTQAWAEA VFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVINSNITPICL PRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGLLARNLMY VDIPIVDHQKCTAAYEKPPYSGGSVTANMLCAGLE SGGKDSCRGDSSGALVFLDNETQRWFGGIVSW GSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIKNIISNF

5	MASP-2 de perro	MRLLLFLGLLCGWAAAAPGPAWSQPLFGRLASPG FPGAYANHQERRWALTAPPGYRLRLYFTHFHLEL SYLCEYDFVKLSSGTEVLATLCGQESTDTERAPG NDTFRSPGSSLDVTFRSDYSNEQPFTGFYAFYAA EDIDECQVSPGEAPPCDHHCHNHLGGFYCSCRQ GYVLHRNKRTCSALCAGQVFTGRSGVLSSPEYPQ PYPKLSSCTYSIRLEEGFSIVLDFVAPFDVESHDA LCPYDSLQVRTDKEEYGPFCGTTLPRIETQSSAV AISFVTDQSGEHAGWRIRYSSSARPCPSPVAPPN GRITPVQAEYVLEDRVAVSCDPGYELLRGSSALE SFTAVCQRDGSWDQPPPRCSAVDCGPPDDLPA RVDFLTGPGVTTYGAGIRYHCDGSFYAMTAGDGK YVCEADGFWTSSKGEKSPPVCEPVCVSTRTE GRIYGGQKAKLGDFPWQVLLLGRTTAAGALLRDN WILTAHAVYTQKAAASSLDIRMGALKRLSAQYTQ ARAEAFIHEGYTPDAGFDNDIALIKLKNRVVINSNV LPICLPRKEAESFMRS DIGTASGWGLTQRGFLAR HLMFVDIPIVDHQKCTAAYEKLSYPGGRVTENMLC AGLEGGGKDSCRGDSSGALVFLDNETQRWFGV GIVSWGSTNCGEANQYGVYTKVINIYIPWIENIINN
6	epítipo único de MASP-2	DIRMGTLKRLSPHYTQAW
7	OMS850 VH progenitor	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFTNYW MHWLKQRPIQGLEWIGDIDPSDSETHYIEKFKDKA TLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCARGDITTT LRYFDVWGTGTTVTVSS
8	OMS860 VH progenitor	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTNYW MHWVRQRPIQGLEWIGDIDPSDSEIYYNQKFKDK

		ATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARGDIT TTLRYFDVWGTGTTVTVSS
9	OMS870 VH progenitor	EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYW MHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNCNEKFKN KATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWA YDAMDYWGQGTSVTVSS
10	OMS850 VL progenitor	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSSVRYMYW YQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGT SNSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTK LELKR
11	OMS860 VL progenitor	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWY QQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS NSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKL ELKR
12	OMS870 VL progenitor	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNS FMHWYQKPGQAPKLLIYFASNLESGVPARFSGSR TDLTIDPVEADDAATYFCQSNEDPLTFGAGTKLEL KR
13	OMS850 VH FR1	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT
14	OMS850/860 VH CDR1	NYWMH
15	OMS850 VH FR2	WLKQRPIQGLEWIG
16	OMS850 VH CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD
17	OMS850 VH FR3	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR

18	OMS850/860 VH CDR3	GDITTTLRYFDV
19	OMS850/860 VH FR4	WGTGTTVTVSS
20	OMS860 VH FR1	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT
21	OMS860 VH FR2	WVRQRPIQGLEWIG
22	OMS860 VH CDR2	DIDPSDSEIYYNQKFKD
23	OMS860 VH FR3	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR
24	OMS870 VH FR1	EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT
25	OMS870 VH CDR1	SYWMH
26	OMS870 VH FR2	WVKQRPGQGLEWIG
27	OMS870 VH CDR2	NINPSNGGTNCNEKFKN
28	OMS870 VH FR3	KATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
29	OMS870 VH CDR3	WAYDAMDY
30	OMS870 VH FR4	WGQGTSVTVSS
31	OMS850 VL FR1	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC

32	OMS850 VL CDR1	SASSSVRYMY
33	OMS850/860 VL FR2	WYQQKPGSSPRLIY
34	OMS850/860 VL CDR2	DTSNLAS
35	OMS850/860 VL FR3	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC
36	OMS850/860 VL CDR3	QQWSSYPLT
37	OMS850/860/ 870 VL FR4	FGAGTKLELKR
38	OMS860 VL FR1	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITC
39	OMS860 VL CDR1	SASSSVSYMY
40	OMS870 VL FR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC
41	OMS870 VL CDR1	RASESVDSYGNSFMH
42	OMS870 VL FR2	WYQQKPGQAPKLLIY
43	OMS870 VL CDR1	FASNLES
44	OMS870 VL FR3	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFC
45	OMS870 VL CDR3	QQSNEDPLT

46	OMS852 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW MHWLRQAPGQGLEWIGDIDPSDSETHYIEKFKDR ATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITT TLRYFDVWGQGGLVTVSS
47	OMS852/854/ 856/858 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRYMYWY QQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFSGSGSGTD NTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPLTFGQGTKV EIKR
48	OMS854 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYW MHWLRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDR ATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITT TLRYFDVWGQGGLVTVSS
49	OMS856 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYH MHWLRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDR ATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITT TLRYFDVWGQGGLVTVSS
50	OMS858 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHH MHWLRQAPGQGLEWIGDIDASDSETHYIEKFKDR ATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITT TLRYFDVWGQGGLVTVSS
51	OMS852/854/ 856/858 VH FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
52	OMS852 VH FR2	WLRQAPGQGLEWIG
53	OMS854/856/ 858 VH CDR2	DIDASDSETHYIEKFKD

54	OMS852/854/ 856/858 VH FR3	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
55	OMS852/854/ 856/858 VH FR4	WGQGTLVTVSS
56	OMS856 VH CDR1	NYHMH
57	OMS858 VH CDR1	NHHMH
58	OMS852 VL FR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC
59	OMS852 VL FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
60	OMS852 VL FR3	GVPSRFSGSGSGTDNTLTISSLQPEDFATYYC
61	OMS852 VL FR4	FGQGTKVEIKR
62	No se utiliza	
63	Secuencia consenso VH CDR2 para OMS850/852/ 854/856/ 858/860	DIDXSDSEXXYXXKFKD donde X en la posición 4 es P o A; X en la posición 9 es T o I; X en la posición 10 es H o Y, X en la posición 12 es I o N; y X en la posición 13 es E o Q
64	Secuencia consenso VL CDR1 para	SASSSVXYMY donde X en la posición 7 es R o S

	OMS850/852/ 854/856/ 858/860	
65	Región constante de cadena pesada de la IgG4 humana	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
66	región constante de cadena pesada de la IgG4 humana con la mutación estabilizadora S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
67	región constante de cadena pesada de la IgG4 humana con la	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

	mutación estabilizadora S228P y las mutaciones potenciadoras de la interacción FcRn de bajo pH	KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSLGK
68	Región constante de cadena ligera kappa humana	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
69	ADN que codifica el OMS850 VH (ratón progenitor)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCT GGTGAGGCCTGGGTCTTCAGTGAGGCTGTCCT GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACT GGATGCATTGGTTGAAGCAGAGGCCTATACAAG GCCTTGAATGGATTGGTGACATTGACCCTTCTG ATAGTGAACTCACTACATTGAAAAGTTCAAGGA CAAGGCCACATTGACTATAGACAAATCCTCCAG CACAGCCTATATGCACCTCAGCAGCCTGACATC TGAGGACTCTGCGATCTATTACTGTGCAAGAGG GGATATTACTACGACCCTTAGGTACTTCGATGT CTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CA
70	ADN que codifica el OMS860 VH	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCT GGTGAGGCCTGGGTCTTCAGTGAAGCTGTCCT GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACT GGATGCATTGGGTGAGACAGAGGCCTATACAA

	(ratón progenitor)	GGCCTTGAATGGATTGGTGACATTGACCCTTCT GATAGTGAAATTTACTACAATCAAAGTTCAAGG ACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCA GCACCGCCTATATGCACCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAG GGGATATTACTACGACCCTTAGGTACTTCGATG TCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCC TCA
71	ADN que codifica el OMS870 VH (ratón progenitor)	GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGACTGAACT GGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTGTCCT GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACT GGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAA GGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGC AATGGTGGTACTAACTGCAATGAGAAGTTCAAG AACAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCC AGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACA TCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGA TGGGCCTACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAA GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
72	ADN que codifica el OMS850 VL (ratón progenitor)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGT CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCT GCAGTGCCAGCTCAAGTGTACGTTACATGTACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAGA CTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTG GAGTCCCTGTTGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACCTCTAACTCTCTCACAATCAGCCGAATGG AGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC AGTGGAGTAGTTACCCACTCACGTTCTGGTGCTG GGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

73	ADN que codifica el OMS860 VL (ratón progenitor)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGT CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACCT GCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACT GGTACCAGCAAAAGCCAGGATCCTCCCCCAGA CTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTG GAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACCTCTAACTCTCTCACAATCAGCCGAATGG AGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC AGTGGAGTAGTTACCCACTCACATTCGGTGCTG GGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
74	ADN que codifica el OMS870 VL (ratón progenitor)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTG GCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATC CTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTTATGG CAACAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACC AGGACAGGCACCCAAACTCCTCATCTATTTTGC ATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCT CACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGC AACCTATTTCTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCC GCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGC TGAAACGG
75	ADN que codifica el OMS852 VH	CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTC AAGAAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTG CAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATTG GATGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAG GGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACCCTTC GGACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAA GGACAGGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCT CCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGA

		GATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTC GACGTCTGGGGACAGGGCACCCCTTGTGACCGT GTCCTCC
76	ADN que codifica el OMS852/854/ 856/858 VL	GATATTCAACTCACCCAGTCCCCTTCATCCCTTT CCGCTTCCGTGCGGTGATAGAGTGACCATCACTT GCTCCGCGAGCTCTAGCGTGCGCTACATGTACT GGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCAAAG TTGCTCATCTATGACACTTCGAACCTGGCCTCC GGGGTGCCGTCACGGTTCTCCGGATCGGGATC GGGAACCGACAACACTCTGACCATTAGCAGCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCA ACAGTGGTCCTCCTACCCGCTGACGTTTGGCCA GGGAACCAAGGTGCGAAATCAAGCGG
77	ADN que codifica el OMS854 VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTC AAGAAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTG CAAAGCCTCCGGTTACACTTTACCAACTATTG GATGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAG GGACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTC GGACTCCGAACTCATTACATTGAGAAGTTCAA GGACAGGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCT CCTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGA GATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGC GGGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTC GACGTCTGGGGACAGGGCACCCCTTGTGACCGT GTCCTCC
78	ADN que codifica el OMS856 VH	CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTC AAGAAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCGTG CAAAGCCTCCGGTTACACTTTACCAACTATCA

		CATGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGG GACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTCG GACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAG GACAGGGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTC CTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAG ATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCG GGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTCTGA CGTCTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGT CCTCC
79	ADN que codifica el OMS858 VH	CAAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTC AAGAAGCCGGGAGCCAGCGTGAAAGTGTCTGTG CAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACCATCA CATGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGG GACTGGAGTGGATCGGGGATATCGACGCCTCG GACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAG GACAGGGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTC CTCGACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAG ATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCG GGGCGACATTACAACGACCCTGCGGTACTTCTGA CGTCTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACCGTGT CCTCC

VII. Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos inhibitorios de MASP-2 antihumano de alta afinidad

Ratones con genes inactivados C57BL/6 MASP-2 de siete a catorce semanas de edad fueron inmunizados con el polipéptido MASP-2 CCP2/SP humano

(residuos de aminoácidos 364 a 686 de la SEQ ID NO:1) y se incluyó una etiqueta 6xHis en el C-terminal, mediante el Sistema Adyuvante Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Se administró a los ratones una inyección intraperitoneal de 50 µg de inmunógeno por ratón mezclado con el adyuvante RIBI en 1:1. Los ratones inmunizados fueron estimulados 14 días después con una administración complementaria de inmunógeno mezclado con el adyuvante RIBI en 1:1. Los ratones fueron estimulados por tercera vez 14 días después con otra administración de 50 µg de inmunógeno mezclado con el adyuvante RIBI en 1:1 en PBS. Las muestras séricas de los ratones se prepararon periódicamente a partir de la sangre de la cola y se analizaron mediante ELISA para la presencia de anticuerpos específicos al antígeno. Los ratones con títulos de anticuerpos significativos recibieron un estímulo de inmunógeno en PBS prefusión cuatro días antes de la fusión esplenogonadal. Tres días antes de la fusión, los ratones se trataron por vía subcutánea en la base de la cola con 50 µg de agonista anti-CD40 mAb en PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) para incrementar el número de células B.

Se sacrificaron los ratones y se cosecharon las células del bazo y se fusionaron a una línea celular de mieloma murino P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC No. TIB18) seleccionada, mediante 50% de polietilenglicol o 50% de polietilenglicol más 10% de DMSO. Las fusiones generaron células de hibridoma que se colocaron en placas de 96 pocillos con cultivo tisular que contenían HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) como medio para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos del bazo. Posterior a la selección del hibridoma, se analizaron los sobrenadantes de los cultivos para la unión a MASP-2 mediante ELISA y para inhibir la activación de la vía de la lectina mediante un ensayo de deposición de C3. Se identificaron los hibridomas positivos y se subclonaron mediante métodos de dilución seriada. El cribado paralelo de los sobrenadantes de los hibridomas arrojó como resultado 75 hibridomas iniciales que fueron positivos tanto para unión a MASP-2 como para función (ensayo de

deposición de C3). Después de cultivos posteriores y de nuevos ensayos, de las 75 hibridomas iniciales 74 se confirmaron positivos para unión, mientras que se confirmó que 39 presentaban actividad funcional; estas 39 hibridomas se clonaron por dilución seriada.

Ejemplo 2

Clonación, purificación y caracterización de los anticuerpos recombinantes

Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera se clonaron a partir de los clones de los 39 hibridomas identificados según se describe en el ejemplo 1, mediante RT-PCR y se secuenciaron. Los mAbs quiméricos humano-ratón que consisten en regiones variables de mAb de ratón fusionadas a las regiones constantes de la cadena pesada de IgG4 humano (SEQ ID NO:66) y de la cadena ligera kappa (SEQ ID NO:68) se obtuvieron como proteínas recombinantes en las células Expi293F. La región bisagra constante IgG4 empleada (SEQ ID NO:66) contiene la sustitución del aminoácido S228P estabilizante. En algunas realizaciones, los mAbs se fusionaron a una región bisagra constante de IgG4 (SEQ ID NO:67) que contiene la sustitución del aminoácido S228P y que también contiene ciertas mutaciones que promueven las interacciones FcRn a un pH bajo.

Se determinó que 26 clones eran anticuerpos monoclonales quiméricos únicos. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron en células Expi293F transfectadas temporalmente, se purificaron y se analizaron para determinar la afinidad de unión al MASP-2 humano y la capacidad de inhibir la activación de la vía de la lectina mediada por el MASP-2.

Para medir la capacidad de unión de los 26 anticuerpos MASP-2 recombinantes purificados al MASP-2 humano (fragmento CCP1-CCP2) se realizó un ELISA de fase sólida según se describe a continuación. Una placa MaxiSorp ELISA se

cubrió con el MASP-2 humano (fragmento CCP1/2/SP) a 1,0 µg/mL en un tampón de carbonato/bicarbonato durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente la placa se bloqueó con BSA/PBS al 1%, se lavó en PBS y luego se incubó durante una hora a temperatura ambiente con diluciones seriadas de mAbs de MASP-2 recombinante en un tampón de bloqueo (PBST + 0,1% BSA). La placa se lavó (PBS-T, 0,05%) y se agregó un anticuerpo de detección (IgG-HRP antihumano de cabra) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado (PBS-T, 0,05%) la placa se cubrió (5 minutos) con OPT EIA TMB (BD Biosciences #555214). La lectura de absorbancia en A450 se midió mediante el lector de placa Spextramax M5e.

De los 26 mAbs quiméricos, se determinó que 22 tenían una buena capacidad de unión al MASP-2 humano (intervalo Kd aparente de 0,1 nM a 1 nM). Cuatro de los 26 mAbs quiméricos presentaron una capacidad despreciable de unión al MASP-2 humano.

A fin de medir la capacidad de los 26 anticuerpos MASP-2 recombinantes purificados para inhibir una activación complementaria de la vía de la lectina, se realizó un ensayo de deposición de C3 según se describe a continuación. El manano se diluyó a una concentración de 50 µg/mL en un tampón de carbonato de 50 mM (15 mM de Na₂CO₃ + 35 mM de NaHCO₃ + 1,5 mM de NaN₃), pH 9,6 y se cubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 µL de BSA en PBS al 1% en los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 µL de PBS que contenía 0,05% de Tween-20 y se almacenaron en hielo con 200 µL de PBS hasta el agregado de las muestras.

El suero humano normal se diluyó a 1,0% en un tampón de GVB/Ca/Mg y los 26 mAbs de MASP-2 purificados se agregaron a este tampón en un intervalo de concentración de 0,00001 a 100 nM y se preincubaron 10 minutos en hielo antes

de su agregado a la placa ELISA bloqueada. La reacción de activación del complemento se inició al transferir las mezclas de preincubación a los pocillos de la placa en ensayo cubierta con manano. Después de una incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo al lavar las placas tres veces con un tampón de lavado ELISA. Se detectó la deposición de C3b con un anticuerpo C3c antihumano (Dako) seguido de un HRP α -conejo cabra (Southern Biotech). El control negativo fue un tampón sin suero (no deposición de C3) y el control positivo fue suero con un anticuerpo no inhibitorio (deposición de C3b máxima). Se estableció un criterio de corte a mediados de la actividad de un mAb irrelevante y tampón solo.

De los 26 mAb quiméricos identificados durante la selección, se determinó que los tres clones con mayor actividad LP inhibitoria en el ensayo de deposición de C3b fueron OMS850, OMS860 y OMS870. Estos tres anticuerpos fueron seleccionados para una posterior caracterización tal como se describe a continuación.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y de las regiones variable de cadena ligera de los clones OMS850, OMS860 y OMS870 se muestran en la FIGURA 3 (la "SIN" = la "SEQ ID NO:" en la FIGURA 3) y se incluyen a continuación. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones marco (FR) de cada uno se proporcionan en las TABLAS 1A, 1B y 1C (arriba) y en las TABLAS 3 a 6 (abajo).

A continuación se presenta la secuencia de la región variable de cadena pesada (VH) para cada anticuerpo inhibitorio de MASP-2 de alta afinidad. Las CDR Kabat están subrayadas.

Regiones variables de cadena pesada:

OMS850 VH: SEQSEQSEQ ID NO:7 (ratón progenitor)

QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFTNYWMHWLKQRPIQGLEWIGDI
DPSDSETHYIEKFKDKATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCARGDITTLR
YFDVWGTGTTVTVSS

OMS860 VH: SEQ ID NO:8 (ratón progenitor)

QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTNYWMHWVRQRPIQGLEWIGDI
DPSDSEIYYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARGDITTT
LRYFDVWGTGTTVTVSS

OMS870 VH: SEQ ID NO: 9 (ratón progenitor)

EVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNI
NPSNGGTNCNEKFKNKATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWAYD
AMDYWGQGTSTVTVSS

TABLA 3: Secuencias de VH del anticuerpo MASP-2 (regiones CDR y FR, Kabat) ratón progenitor

Anticuerpo	VH FR1	VH CDR1
OMS850	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT (SIN 13)	NYWMH (SIN 14)
OMS860	QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFT (SIN 20)	NYWMH (SIN 14)
OMS870	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT (SIN 24)	SYWMH (SIN 25)
Anticuerpo	VH FR2	VH CDR2
OMS850	WLKQRPIQGLEWIG (SIN 15)	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)

OMS860	WVRQRPIQGLEWIG (SIN 21)	DIDPSDSEIYYNQKFKD (SIN 22)
OMS870	WVKQRPGQGLEWIG (SIN 26)	NINPSNGGTNCNEKFKI (SIN 27)
Anticuerpo	VH FR3	VH CDR3
OMS850	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR (SIN 17)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS860	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR (SIN 23)	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS870	KATMTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SIN 28)	WAYDAMDY (SIN 29)
Anticuerpo	VH FR4	
OMS850	WGTGTTVTVSS (SIN 19)	
OMS860	WGTGTTVTVSS (SIN 19)	
OMS870	WGQGTSVTVSS (SIN 30)	

A continuación, se presentan las secuencias de la región variable de cadena ligera (VL) para los anticuerpos inhibitorios de MASP-2 de alta afinidad. Las CDR Kabat están subrayadas. Estas regiones son las mismas ya sea que se enumeren por el sistema Kabat o el sistema Chothia.

Regiones variables de cadena ligera:

OMS850 VL: SEQ ID NO:10 (ratón progenitor)

QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSSVRYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNL
ASGVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLEL
KR

OMS860 VL: SEQ ID NO:11 (ratón progenitor)

QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNL
ASGVFVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGAGTKLEL
 KR

OMS870 VL: SEQ ID NO:12 (ratón progenitor)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQAPKLLIY
FASNLESGVFVRFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFCQQSNEDPLTFGAG
 TKLELKR

TABLA 4: Secuencias de VL del anticuerpo MASP-2 (regiones CDR y FR, Kabat) ratón progenitor

Anticuerpo	VL FR1	VL CDR1
OMS850	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC (SIN 31)	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS860	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTITC (SIN 38)	SASSSVSYMY (SIN 39)
OMS870	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC (SIN 40)	RASESVDSYGNSFMH (SIN 41)
Anticuerpo	VL FR2	VL CDR2
OMS850	WYQQKPGSSPRLLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS860	WYQQKPGSSPRLLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS870	WYQQKPGQAPKLLIY (SIN 42)	FASNLES (SIN 43)
Anticuerpo	VL FR3	VL CDR3

OMS850	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC (SIN 35)	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS860	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC (SIN 35)	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS870	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYFC (SIN 44)	QQSNEDPLT (SIN 45)
Anticuerpo	VL FR4	
OMS850	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS860	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS870	FGAGTKLELKR (SIN 37)	

TABLA 5: Secuencias de consenso para las CDR de VH de OMS850 y OMS860

Anticuerpo	Región	Secuencia
OMS850	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS860	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS852	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS854	VH-CDR1	NYWMH (SIN 14)
OMS856	VH-CDR1	NYHMH (SIN 56)
OMS858	HC- CDR1	NHHMH (SIN 57)
Consenso	VH-CDR1	NXXMH Donde X en la posición 2 es H o Y, y Donde X en la posición 3 es H o W
OMS850	VH-CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS860	VH-CDR2	DIDPSDSEIYYNQKFKD (SIN 22)

OMS852	VH-CDR2	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS854	VH-CDR2	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS856	VH-CDR2	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS858	VH-CDR2	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
Consenso	VH-CDR2	DIDXSDSEXXYXXKFKD (SIN 63), Donde X en la posición 4 es P o A; Donde X en la posición 9 es T o I; X en la posición 10 es H o Y, y X en la posición 12 es I o N; y X en la posición 13 es E o Q
OMS850	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS860	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS852	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS854	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS856	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
OMS858	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)
Consenso	VH-CDR3	GDITTTLRYFDV (SIN 18)

TABLA 6: Secuencias de consenso para las CDR de VL de OMS850 y OMS860

Anticuerpo	Región	Secuencia
OMS850	VL-CDR1	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS860	VL-CDR1	SASSSVSYMY (SIN 39)
OMS852	VL-CDR1	SASSSVRYMY (SIN 32)
Consenso	VL-CDR1	SASSSVXYMY, (SIN 64) Donde X en la posición 7 es R o S
OMS850	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
OMS860	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)

OMS852	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
Consenso	VL-CDR2	DTSNLAS (SIN 34)
OMS850	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS860	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS852	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)
Consenso	VL-CDR3	QQWSSYPLT (SIN 36)

Ejemplo 3

Posterior caracterización de los anticuerpos inhibitorios de MASP-2 candidatos.

1. Unión al MASP-2 humano recombinante

Se realizó un ensayo ELISA de fase sólida para medir la capacidad de unión al MASP-2 humano de los tres anticuerpos inhibitorios de MASP-2 seleccionados (fragmento CCP1-CCP2-SP) tal como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en las FIGURAS 4A a D y se resumen en la TABLA 7 a continuación.

TABLA 7: Resultados del ensayo de unión a MASP-2

mAb	EC₅₀
OMS850	0,25 nM
OMS860	0,23 nM
OMS870	0,41 nM

2. Ensayo de deposición de C3b en suero humano, de macaco cangrejero, de rata y de ratón.

Los tres anticuerpos MASP-2 seleccionados descritos en el ejemplo 2 fueron expresados, purificados y diluidos a la misma concentración de stock, la cual se diluyó nuevamente en un tampón GVB que contenía Ca^{++} y Mg^{++} (4,0 mM de barbital, 141 mM de NaCl, 1,0 mM de MgCl_2 , 2,0 mM de CaCl_2 , 0,1% de gelatina, pH 7,4) para asegurar que todos los clones de anticuerpo tuvieran la misma cantidad de tampón.

A. Ensayo de deposición de C3b en suero humano

El manano se diluyó a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ en un tampón de carbonato (15 mM de Na_2CO_3 + 35 mM de NaHCO_3), pH 9,6 y se cubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 μL de BSA al 1% en una solución de bloqueo PBS a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 μL PBS que contenía 0,05% de Tween-20 (tampón de lavado ELISA).

El suero humano normal se diluyó a 1,0% en un tampón de GVB/ Ca / Mg y los clones de mAbs MASP-2 OMS850, OMS860 y OMS870 se agregaron al intervalo final de concentración de 0,00001 a 100 nM y se preincubaron 15 minutos en hielo. La reacción se inició al transferir las mezclas de preincubación a los pocillos de la placa bloqueada, cubierta con manano seguido de una incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al lavar la placa tres veces en un tampón de lavado y se detectó la deposición de C3b con un anticuerpo C3c antihumano (Dako) seguido de un HRP α -conejo cabra (Southern Biotech). El control negativo fue un tampón sin suero y un anticuerpo (que resultó en una no deposición de C3b) y el control positivo fue un suero sin anticuerpo (deposición de C3b máxima). Se estableció un criterio de corte a mediados de la actividad de un mAb irrelevante y tampón solo.

B. Ensayo de deposición de C3b en suero de macacos cangrejeros

El manano se diluyó a una concentración de 50 µg/mL en un tampón de carbonato (15 mM de Na₂CO₃ + 35 mM de NaHCO₃), pH 9,6 y se cubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 µL de BSA al 1% en una solución de bloqueo PBS a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 µL PBS/tween-20.

El suero de macaco cangrejero se diluyó a 0,25% en un tampón de GVB/Ca/Mg y los clones de mAbs MASP-2 OMS850, OMS860 y OMS870 se agregaron al intervalo final de concentración de 0,00001 a 100 nM y se preincubaron 15 minutos en hielo. La reacción se inició al transferir las mezclas de preincubación a los pocillos de la placa bloqueada, cubierta con manano seguido de una incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al lavar la placa tres veces con PBS/Tween-20. Se detectó la deposición de C3b con un anticuerpo C3c antihumano (Dako) seguido de un HRP α-conejo cabra (Southern Biotech). El control negativo fue un tampón sin suero y un anticuerpo (que resultó en una no deposición de C3b) y el control positivo fue un suero sin anticuerpo (deposición de C3b máxima). Se estableció un criterio de corte a mediados de la actividad de un mAb irrelevante y tampón solo.

C. Ensayo de deposición de C3 en suero de rata

El manano se diluyó a una concentración de 50 µg/mL en un tampón de carbonato (15 mM de Na₂CO₃ + 35 mM de NaHCO₃ + 1,5 mM de NaN₃), pH 9,6 y se cubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 µL de BSA al 1% en una solución de bloqueo PBS a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 µL PBS/tween-20.

El suero de rata se diluyó a 0,3% en un tampón de GVB/Ca/Mg y los clones de mAbs MASP-2 OMS850, OMS860 y OMS870 se agregaron al intervalo final de concentración de 0,00001 a 100 nM y se preincubaron 15 minutos en hielo. La reacción se inició al transferir las mezclas de preincubación a los pocillos de la placa bloqueada, cubierta con manano seguido de una incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al lavar la placa tres veces con un tampón de lavado. Se detectó la deposición de C3b con un anticuerpo C3c antihumano (Dako) seguido de un HRP α -conejo cabra (Southern Biotech). El control negativo fue un tampón sin suero y un anticuerpo (que resultó en una no deposición de C3b) y el control positivo fue un suero sin anticuerpo (deposición de C3b máxima). Se estableció un criterio de corte a mediados de la actividad de un mAb irrelevante y tampón solo.

D. Ensayo de deposición de C3b en suero de ratón

El manano se diluyó a una concentración de 50 μ g/mL en un tampón de carbonato (15 mM de Na₂CO₃ + 35 mM de NaHCO₃ + 1,5 mM de NaN₃), pH 9,6 y se cubrió en una placa ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 μ L de BSA al 1% en una solución de bloqueo PBS a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 μ L PBS/tween-20.

El suero de Ratón se diluyó a 1,0% en un tampón de GVB/Ca/Mg y los clones de mAbs MASP-2 OMS850, OMS860 y OMS870 se agregaron al intervalo final de concentración de 0,00001 a 100 nM y se preincubaron 15 minutos en hielo. La reacción se inició al transferir las mezclas de preincubación a los pocillos de la placa bloqueada, cubierta con manano seguido de una incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo al transferir las placas a un baño de hielo. Se detectó la deposición de C3b con un anticuerpo C3c antihumano (Dako) seguido de un HRP α -conejo cabra (Southern Biotech). El

control negativo fue un tampón sin suero y un anticuerpo (que resultó en una no deposición de C3b) y el control positivo fue un suero sin anticuerpo (deposición de C3b máxima). Se estableció un criterio de corte a mediados de la actividad de un mAb irrelevante y tampón solo.

Los resultados se muestran en las FIGURAS 5A, 5B, 5C y 5D y se resumen en la TABLA 8 a continuación. El punto de datos indicado como “tampón” en las FIGURAS 5A a 5D es un control negativo solo de tampón.

TABLA 8: Resultados del ensayo de deposición de C3b

mAb	Humano (IC₅₀ nM)	Macaco cangrejero (IC₅₀ nM)	Rata (IC₅₀ nM)	Ratón (IC₅₀ nM)
OMS850	0,15	0,4	0,05	0,5
OMS860	0,6	26,2	0,3	5,8
OMS870	0,13	18,9	0,6	>100

3. Ensayo de deposición de C4b en suero humano al 50%

Se diluyó manano en una concentración de 50 µg/mL en un tampón de carbonato (15 mM Na₂CO₃ + 35 mM NaHCO₃ + 1,5 mM NaN₃), pH 9,6 y se cubrió una placa para ELISA durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se agregaron 250 µL de BSA al 1% en una solución bloqueadora de PBS a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 300 µL PBS/tween-20.

Se diluyó suero humano normal al 50,0% en PBS, y se agregaron clones de mAb de MASP-2 OMS850, OMS860 y OMS870 en un intervalo de concentración final

de 0,0001 nM a 100 nM a este tampón y se preincubó en hielo durante 15 minutos. La reacción se inició con la transferencia de las mezclas de preincubación a la placa para ELISA bloqueada y cubierta de manano, seguido de incubación durante 7 minutos a 4 °C. Se detectó deposición de C4b con un anticuerpo C4c antihumano (Dako) seguido de HRP α -Conejo de cabra (Southern Biotech). El control negativo fue tampón sin suero y anticuerpo (= no hubo deposición de C4b). El fondo se determinó solamente en tampón recibido en pocillos. Se estableció un criterio de corte en la mitad de la actividad de un mAb irrelevante y solamente tampón.

Los resultados se muestran abajo en la FIGURA 6 y en la TABLA 9. El punto de datos indicado como “tampón” en la FIGURA 6 es un control negativo solo con tampón.

TABLA 9: Resultados del ensayo de deposición de C4b

mAb	Deposición de C4b humana (IC₅₀ µg/mL)
OMS850	0,07
OMS860	0,1
OMS870	0,09

Se eligió el anticuerpo OMS850 para humanización y optimización adicional en vista de la buena potencia en humanos, ratones, ratas y macacos cangrejeros conforme se describe arriba.

Ejemplo 4

Humanización del mAb de MASP-2 OMS850 y producción de variantes

Previo a la humanización, el mAb inhibidor anti-MASP-2 OMS850 se analizó para

modificación postraducciona. Se identificó un “DP” de diseño de isomerización de ácido aspártico en VH CDR2 (DIDPSDSETHYIEKFKD (SEQ ID NO: 16)) de OMS850. Se generaron variantes de OMS850 mediante mutagénesis específica puntual para modificar P53 a A, N, D, L, S y T. Las variantes se expresaron y purificaron conforme se describe arriba. Se determinó la afinidad mediante ELISA y se evaluó la potencia mediante un ensayo de deposición de C3 en suero humano utilizando los formatos de IgG4 intactos descritos arriba.

Los resultados se muestran abajo, en la FIGURA 7 y se presentan en la TABLA 10.

TABLA 10: Resultados del ensayo de deposición de C3b

mAb	Deposición de C3b humana (IC₅₀ nM)
OMS850	0,09
OMS850_VH_P53/A	0,07
OMS850_VH_P53/N	0,53
OMS850_VH_P53/D	0,16

Como se muestra en la FIGURA 7, se determinó, en un ensayo de deposición de C3b, que OMS850 VH P53A tuvo la mejor potencia en suero humano como se evaluó en el ensayo de deposición de C3b. Por lo tanto, esta sustitución de P53A se incorporó durante la humanización subsiguiente descrita abajo.

Para reducir el riesgo de inmunogenia, se humanizó un anticuerpo inhibidor de MASP-2 de afinidad alta representativo OMS850 mediante un método de injerto de CDR. Los CDR de mAb OMS850 se injertaron en las secuencias estructurales humanas de consenso más próximas. Algunos de los residuos de zona Vernier se modificaron mediante mutagénesis específica puntual QuickChange (Agilent

Technologies). Las regiones humanizadas VH y VL resultantes se transfirieron a constructos de expresión de IgK y IgG4 de humano según pcDNA3.1, y los anticuerpos recombinantes se expresaron y purificaron conforme se describe arriba. La afinidad de los anticuerpos humanizados se determinó mediante ELISA, y la potencia se evaluó mediante ensayo de deposición de C3 utilizando formatos de IgG4 intactos en suero humano al 1% utilizando los métodos descritos arriba en el Ejemplo 3.

Se desarrolló un primer prototipo humanizado y se denominó OMS852. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y de cadena pesada humanizada OMS852 se presenta abajo. Los CDR (Kabat) están subrayados.

Secuencia completa de OMS852 VH (humanizado): (SEQ ID NO: 46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWLRQAPGQGLEWIGDI
DPSDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTL
RYFDVWGQGTLVTVSS

Secuencia completa de OMS852 VL (humanizado) (SEQ ID NO: 47)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYCQQWSSYPLTFGQGTKVEIK
R

Los resultados del ensayo de deposición de C3b con varias versiones modificadas del mAb OMS850 en comparación con el mAb progenitor OMS850 se muestran en las FIGURAS 8A y 8B y se resumen en la TABLA 11.

TABLA 11: Resultados del ensayo de deposición de C3b para candidatos humanizados de OMS850

mAb	Deposición de C3b humana (IC ₅₀ nM)
OMS850 progenitor	0,15; 0,12
OMS852 (4-11)	0,16
OMS852 (4PA-2)	0,12; 0,10
OMS852 (4PA-4)	0,15
OMS852 (4PA-1)	0,09
OMS852 (4PA-6)	0,17

Al anticuerpo monoclonal OMS852 4PA-1, que está humanizado e incorpora la modificación P53A identificada previamente, se seleccionó para mayor desarrollo, y se lo denominó OMS854.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada para el anticuerpo humanizado OMS854 se presentan abajo. Los CDR (Kabat) están subrayados.

Secuencia completa de OMS854 VH: (SEQ ID NO: 48)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHWLRQAPGQGLEWIGDI
DASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTL
RYFDVWGQGTLVTVSS

Secuencia completa de OMS854 VL (humanizado) (SEQ ID NO: 47)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVRYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDNTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPLTFGQGTKVEIK
R

Como se muestra en la TABLA 12, se hicieron más modificaciones al VH CDR1 de manera que incluya al menos una, u opcionalmente dos, u opcionalmente tres histidinas. Una variante con dos histidinas se denominó OMS856. Una variante

con tres histidinas se denominó OMS858.

Secuencia completa de OMS856 VH (SEQ ID NO: 49)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYHMHWLRQAPGQGLEWIGDI
DASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTL
RYFDVWGQGTLVTVSS

Secuencia completa de OMS858 VH (SEQ ID NO: 50)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHHMHWLRQAPGQGLEWIGDI
DASDSETHYIEKFKDRATLTIDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDITTTL
RYFDVWGQGTLVTVSS

TABLA 12: Secuencias VH del anticuerpo MASP-2 (regiones CDR y FR, Kabat)

Anticuerpo	VH FR1	VH CDR1
OMS850	QVQLQQPGAELVRPGSSVRLSCKASGYTFT (SIN 13)	NYWMH (SIN 14)
OMS852	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYWMH (SIN 14)
OMS854	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYWMH (SIN 14)
OMS856	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NYHMH (SIN 56)
OMS858	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (SIN 51)	NHHMH (SIN 57)
Anticuerpo	VH FR2	VH CDR2
OMS850	WLKQRPIQGLEWIG (SIN 15)	DIDP <u>S</u> DSETHYIEKFKD (SIN 16)

OMS852	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DIDPSDSETHYIEKFKD (SIN 16)
OMS854	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS856	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
OMS858	WLRQAPGQGLEWIG (SIN 52)	DID <u>A</u> SDSETHYIEKFKD (SIN 53)
Anticuerpo	VH FR3	VH CDR3
OMS850	KATLTIDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAIYYCAR (SIN 17)	GDITTTLR YFDV (SIN 18)
OMS852	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLR YFDV (SIN 18)
OMS854	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLR YFDV (SIN 18)
OMS856	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLR YFDV (SIN 18)
OMS858	RATLTIDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SIN 54)	GDITTTLR YFDV (SIN 18)
Anticuerpo	VH FR4	
OMS850	WGTGTTVT VSS (SIN 19)	
OMS852	WGQGTLVT VSS (SIN 55)	
OMS854	WGQGTLVT VSS (SIN 55)	
OMS856	WGQGTLVT VSS (SIN 55)	
OMS858	WGQGTLVT VSS (SIN 55)	

TABLA 13: Secuencias VL del anticuerpo MASP-2 (regiones CDR y FR, Kabat)

Anticuerpo	VL FR1	VL CDR1
OMS850	QIVLTQSPVIMSASPGEKVTMTC (SIN 31)	SASSSVRYMY (SIN 32)
OMS852	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITC (SIN 58)	SASSSVRYMY (SIN 32)
Anticuerpo	VL FR2	VL CDR2
OMS850	WYQQKPGSSPRLIY (SIN 33)	DTSNLAS (SIN 34)
OMS852	WYQQKPGKAPKLLIY (SIN 59)	DTSNLAS (SIN 34)
Anticuerpo	VL FR3	VL CDR3
OMS850	GVPVRFSGSGSGTSNSLTISRMEAEDAATYYC (SIN 35)	QQWSSYPLT (SIN 36)
OMS852	GVPSRFSGSGSGTDNTLTISLQPEDFATYYC (SIN 60)	QQWSSYPLT(SIN 36)
Anticuerpo	VL FR4	
OMS850	FGAGTKLELKR (SIN 37)	
OMS852	FGQGTKVEIKR (SIN 61)	

SEQ ID NO:65: región constante de IgG4 humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 66: región constante de IgG4 humana con mutación S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 67: región constante de IgG4 humana con mutación S228P y
también una mutación (Xtend) que promueve interacciones de FcRn a pH bajo.

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALH
SHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:68: región constante de IgK humana

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO:69: ADN que codifica el OMS850 VH (ratón progenitor)

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTT
CAGTGAGGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGG

ATGCATTGGTTGAAGCAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGGTGA
CATTGACCCTTCTGATAGTGAACTCACTACATTGAAAAGTTCAAGGACAA
GGCCACATTGACTATAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATGCACCTCAG
CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGATCTATTACTGTGCAAGAGGGGATA
TTACTACGACCCTTAGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:70: ADN que codifica el OMS860 VH (ratón progenitor)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTT
CAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGG
ATGCATTGGGTGAGACAGAGGCCTATACAAGGCCTTGAATGGATTGGTGA
CATTGACCCTTCTGATAGTGAAATTTACTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAG
GCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACCGCCTATATGCACCTCAGC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGATAT
TACTACGACCCTTAGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:71: ADN que codifica el OMS870 VH (ratón progenitor)

GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGG
ATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAA
TATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTGCAATGAGAAGTTCAAGAACAA
GGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGATGGGCC
TACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC
A

SEQ ID NO:72: ADN que codifica el OMS850 VL (ratón progenitor)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAG
AAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGACGTTACATGTACTG

GTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGACACAT
CCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACCTCTAACTCTCTCACAAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACT
TATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCACTCACGTTCCGGTGCTGGGAC
CAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:73: ADN que codifica el OMS860 VL (ratón progenitor)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGTAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAG
AAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGG
TACCAGCAAAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCC
AACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
CTCTAACTCTCTCACAAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA
TTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCACTCACATTCCGGTGCTGGGACCA
AGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:74: ADN que codifica el OMS870 VL (ratón progenitor)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTTATGGCAA
CAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCCAAACTCC
TCATCTATTTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTG
GCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCT
GATGATGCTGCAACCTATTTCTGTGAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACG
TTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:75: ADN que codifica el OMS852 VH

CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCA
GCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGA
TGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGG
ATATCGACCCCTTCGGACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACA
GGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAACTG
TCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGGCGA

CATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGTCTGGGGACAGGGCACCCTTG
TGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO:76: ADN que codifica el OMS852 VL

GATATTCAACTCACCCAGTCCCCTTCATCCCTTTCCGCTTCCGTCCGTGAT
AGAGTGACCATCACTTGCTCCGCGAGCTCTAGCGTGCGCTACATGTACTG
GTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCCAAAGTTGCTCATCTATGACACTT
CGAACCTGGCCTCCGGGGTGCCGTACGGTTCTCCGGATCGGGATCGGG
AACCGACAACACTCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCA
CCTACTACTGTCAACAGTGGTCCTCCTACCCGCTGACGTTTGGCCAGGGA
ACCAAGGTCGAAATCAAGCGG

SEQ ID NO:77: ADN que codifica el OMS854

CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCA
GCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATTGGA
TGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGG
ATATCGACGCCTCGGACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACA
GGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTG
TCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGGCGA
CATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGTCTGGGGACAGGGCACCCTTG
TGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO:78: ADN que codifica el OMS856

CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCA
GCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACTATCACA
TGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGG
ATATCGACGCCTCGGACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACA
GGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTG
TCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGGCGA

CATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGTCTGGGGACAGGGCACCCTTG
TGACCGTGTCTCC

SEQ ID NO:79: ADN que codifica el OMS858

CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGAGCAGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCA
GCGTGAAAGTGTCGTGCAAAGCCTCCGGTTACACTTTCACCAACCATCACA
TGCACTGGCTGCGCCAGGCGCCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGGG
ATATCGACGCCTCGGACTCCGAAACTCATTACATTGAGAAGTTCAAGGACA
GGGCCACCCTCACCATCGATAAGAGCTCCTCGACCGCCTACATGGAAGTG
TCCAGCCTGAGATCAGAGGATACTGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGGCGA
CATTACAACGACCCTGCGGTACTTCGACGTCTGGGGACAGGGCACCCTTG
TGACCGTGTCTCC

Ejemplo 5

El anticuerpo OMS858 bloquea específicamente la vía de la lectina

El efecto del mAb OMS858 en la deposición del complejo de ataque de membrana (MAC) se analizó utilizando condiciones específicas de la vía para la vía de la lectina, la vía clásica y la vía alternativa. Para este fin, se utilizó el kit de cribado complementario Wieslab COMPL300 (Wieslab, Lund, Sweden) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la vía clásica, el complemento se activó en IgM. Para la vía de la lectina, el complemento se activó en manano, y para la vía alternativa, el complemento se activó en LPS.

La FIGURA 9A ilustra gráficamente la cantidad de deposición de MAC en presencia o ausencia del anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía clásica. La FIGURA 9B ilustra gráficamente la cantidad de deposición de MAC en presencia o ausencia del anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina. La FIGURA 9C ilustra gráficamente la cantidad de deposición de MAC en

presencia o ausencia del anticuerpo anti-MASP-2 OMS858 en condiciones de ensayo específicas de la vía alternativa.

Como se muestra en la FIGURA 9B, el mAb OMS858 bloquea la activación mediada por la vía de la lectina de una deposición de MAC con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1 nM. Sin embargo, el mAb OMS858 no tuvo efecto en la deposición de MAC iniciada mediante activación mediada por la vía clásica (FIGURA 9A) o de activación mediada por la vía alternativa (FIGURA 9C). Un anticuerpo anti-C1s (TNT003), conocido por inhibir la vía clásica, se incluye como un control en la FIGURA 9A. Un anticuerpo anti-Factor B, conocido por inhibir la vía alternativa, se incluye como un control en las FIGURAS 9B y 9C.

Ejemplo 6

Análisis de epítomos de unión a MASP-2 para los anticuerpos OMS850, OMS858, OMS860, OMS870

El anticuerpo OMS858 fue biotinilado y se evaluó su capacidad de unirse concurrentemente con varios anticuerpos MASP-2 diferentes en un ensayo de unión de interferometría de biocapa Octet como se indica a continuación.

El anticuerpo OMS858 se biotiniló utilizando EZ-link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Fischer Scientific, A39257). El Biosensor Super Streptavidin (SSA) (Fortebio 18-5057) se hidrató en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se capturaron 3 mL de OMS858 biotinilado de 50 nM en el chip BLI, seguido de la captura de hMASP-2-CCP1-CCP2-SP. Se preparó una solución de 500 nM de uno de cinco anticuerpos anti-MASP-2 de prueba en un tampón de inmovilización (PBS, 0,02% BSA, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Los anticuerpos de prueba utilizados fueron OMS850, OMS860, y OMS870, cuya producción se describe arriba, y anticuerpos anti-MASP-2 OMS721 y 4A8 identificados anteriormente. Los pocillos de la placa en la primera columna recibieron 200 μ L de OMS858 biotinilado y los pocillos de la siguiente columna recibieron 200 μ L de hMASP-2-

CCP1-CCP2-SP. En una columna separada en la placa, se agregaron 200 μ L de anticuerpos de prueba de 500 nM a cada pocillo. También se realizaron controles utilizando OMS858 no biotinilado o solamente tampón en lugar de un anticuerpo de prueba.

El ensayo de unión se llevó a cabo en el Octet siguiendo estos pasos: establecimiento del valor inicial (60 s), carga de OMS858 biotinilado (180 s), establecimiento del valor inicial (60 s), carga de hMASP-2-CCP1-CCP2-SP (180 s), seguido de asociación del anticuerpo de prueba (300 s) y disociación (300 s).

Cómo lo muestra la FIGURA 10, los anticuerpos OMS850, OMS860 y OMS870 no pudieron unirse a MASP-2 capturada por OMS858, lo que indica que estos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a uno parcialmente superpuesto en MASP-2. En contraste, los anticuerpos anti-MASP-2 previamente identificados OMS721 y 4A8 pudieron unirse a MASP-2 capturado por OMS858, lo que indica que estos dos anticuerpos se unen a un epítipo en MASP-2 diferente a OMS850, OMS860, OMS870 y OMS858.

Ejemplo 7

Cristalización de proteína MASP-2 y complejo Fab mAb OMS858

1. Preparación de la proteína MASP-2

Se preparó una proteína MASP-2 recombinante, según UniProt O00187, serina proteasa-2 asociada a lectina que se une a manano humana, como se indica a continuación. Se generaron constructos de expresión para MASP-2 CCP2-SP y CCP2-SP-6HIS humana para expresión recombinante en células de *E. Coli*. Se llevó a cabo una expresión recombinante de MASP-2 en *E. Coli* como cuerpos de inclusión y purificación de proteína según los métodos descritos en Ambrus G. *et al.*, 2003, con leves modificaciones. Para la versión etiquetada HIS, la

proteína MASP-2 (CCP2-SP-6HIS) se purificó en condiciones desnaturalizadoras según los métodos descritos en Ni-NTA Superflow Cartridge Handbook, Qiagen, March 2007.

La purificación de MASP-2 incluyó extracción, despliegue, repliegue y cromatografía utilizando los métodos estándar descritos por Harmat *et al.*, J. Mol. Biol. 2004;342:1533–1546; y Gal *et al.*, J. Biol. Chem. 2005;280:33435–33444; y Ambrus *et al.* J Immunol. 2003 Feb 1;170(3):1374-82. Tras la cromatografía de exclusión de tamaño, la proteína MASP-2 recombinante se concentró de 5 mg/mL a 20 mg/mL con concentrador de giro (Amicon NMWL 10 kDA). Se congelaron instantáneamente muestras de proteína MASP-2 concentrada y se almacenaron hasta descongelarse para la formación de complejos. La purificación y la segmentación fueron monitoreadas por SDS-PAGE con tinción por Commassie Blue Simply Blue™ Safe Stain (Invitrogen).

2. Preparación de la proteína Fab mAb OMS858

OMS858 Fab se generó al someter el mAb OMS858 a una segmentación proteolítica utilizando el kit de Fab de FAbALACTICA® según las instrucciones del fabricante.

3. Generación del complejo de Fab mAb MASP-2 OMS858

Las muestras de las proteínas Fab mAb OMS858 y MASP-2 se incubaron en la misma concentración molar durante una hora. La generación exitosa del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858 se verificó mediante cromatografía de exclusión de tamaño analítica.

4. Cristalización del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858

Las pruebas de cristalización se configuraron como experimentos de difusión de vapor y gota sentada mediante la combinación de volúmenes idénticos de la solución del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858 con formulaciones de cristalización disponibles comercialmente. Las muestras de complejos de proteína mAb MASP-2-Fab OMS858 se utilizaron en una concentración proteínica de 5 mg/mL a 20 mg/mL. Los cristales de mAb MASP-2-Fab OMS858 aparecieron en menos de dos meses en la formulación de cristalización que contiene 100 mM de acetato de sodio con pH 5,26, 200 mM de sulfato de amonio, y PEG al 10,45% 2000 MME. Los cristales se capturaron con asas criogénicas, se crioprotegieron con glicerol al 20% en formulación de cristalización antes de refrigeración instantánea en nitrógeno líquido.

Ejemplo 8

Cristalografía de rayos X

Los cristales del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858, preparados como se describe en el Ejemplo 7, se difractaron con rayos X de sincrotrón de 1,0 Å de longitud de onda y se recopilieron conjuntos de datos de difracción de rayos X en las líneas de luz SSRL BL9-2, BL14-1, BL12-2 así como el sector 5 ALS utilizando detectores Eiger y Dectris Pilatus. En la TABLA 14, se presenta un resumen de parámetros de cristal, recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para cristales del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858. La estructura de rayos X se determinó mediante reemplazo molecular utilizando porciones de la estructura 1Q3X y porciones de 3C08 como modelos de búsqueda y parcialmente refinado con Buster 2.10.2 o Refmac 5.8. Las densidades de electrones se inspeccionaron con Coot (Emsley *et al.*, 2010) y se sometieron a ciclos de refinamiento y construcción de modelo iterativo hasta que la densidad de MASP-2 y Fab mAb OMS858 fue claramente visible y suficientes de factores R; en este punto el refinamiento parcial se consideró completo y se inspeccionaron los modelos para los ligandos, el solvente y la proteína.

TABLA 14. Resumen de parámetros de cristal, recopilación de datos y estadísticas de refinamiento para los cristales del complejo de mAb MASP-2-Fab OMS858.

Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento	
Grupo espacial	C 1 2 1
Parámetros celulares unitarios	a = 169,37Å, b = 69,04Å, c = 81,76Å, $\alpha = 90,0^\circ$, $\beta = 98,17^\circ$, $\gamma = 90,0^\circ$
Recopilación de datos	
Longitud de onda (Å)	1,0
Intervalo de resolución (Å)	39,6-2,90 (3,08-2,90)
N.º de observaciones	85.344
N.º de reflexiones únicas	20.232
Compleitud (%)	96,9 (94,0)
I/ σ media (I)	7,0 (1,0)
Ruñón en I (%)	12,1 (132,0)
Rmed en I (%)	13,9 (152,0)
Rp.i.m. en (%)	6,7 (74,1)
Modelo y estadísticas de refinamiento	
Intervalo de resolución (Å)	39,6-2,90
N.º de reflexiones (total)	19.207
N.º de reflexiones(prueba)	963
Compleitud (% total)	96,27%
Criterios de corte $ F > 0$	
Rcrist	26,9
Rlibre	30,7
Parámetros estereoquímicos	

Longitud de enlace de RMSD de restricción (Å)	0,007
Ángulo de enlace de RMSD de restricción (°)	1,71
Valor B isotrópico promedio, proteína (Å ²)	94,9
Error coordinado (según probabilidad máxima, Å)	0,47
Residuos proteicos	689
Gráfico de Ramachandran: residuos (%) en preferidos/permitidos	71,7%/15,7%

Ejemplo 9

Análisis de estructura cristalina

Se analizaron estructuras refinadas para distancias y tipos de interacción proteína-proteína y -solvente, utilizando LigPlot+ (Laskowski y Swindells, 2011) con parámetros configurados para 3,35 Å para la distancia máxima entre el dador de enlace de nitrógeno y el receptor, y parámetros de contacto de no unión entre hidrófobo a cualquier contacto, tal como interacciones de van der Waals con distancia de contacto máxima de 3,90 Å.

La TABLA 15 muestra enlaces H entre átomos de mAb OMS858 y MASP-2. La TABLA 16 muestra interacciones de van der Waals de átomos de MASP-2 con átomos de Fab mAb OMS858 que resultan del análisis según LigPlot+ de la estructura cristalográfica, utilizando una configuración de “Anticuerpo”. LigPlot+ los denomina “contactos no unidos” o “contactos hidrófobos”. A pesar del nombre, hay pares de átomos que incluyen posibles enlaces H. Entonces, en algunas instancias, la TABLA 16 también contiene interacciones de enlace-H.

La FIGURA 11 es un diagrama esquemático que muestra la configuración y los contactos entre el dominio de serina proteasa del MASP-2 y Fab mAb OMS858.

La FIGURA 12A es un diagrama esquemático que muestra el epítipo de MASP-2 al que se une mAb OMS858, que incluye los siguientes residuos en el dominio SP de MASP-2: ASP496; LYS503; SER506; PRO507; HIS508 y TRP513. Como lo muestra la FIGURA 12A, el epítipo al cual se une OMS858 comprende dos parches, el primero incluye ASP496 y TRP513 y el segundo incluye LYS503; SER506; PRO507 y HIS508.

La FIGURA 12B es un diagrama esquemático que muestra el paratopo de mAb OMS858 que se une al epítipo MASP-2 que se muestra en la FIGURA 12A. Como se muestra en la FIGURA 12B, el paratopo comprende dos parches correspondientes conectados con contribuciones de la cadena ligera y la cadena pesada y en particular, residuos de cadena pesada HIS33; ASP50; ASP52; ASP55; GLU57; HIS59 y residuos de cadena ligera TYR31; ARG30 y TRP90.

Se determinó que hay tres enlaces de hidrógeno y 36 contactos de van der Waals como se indica a continuación:

TABLA 15: Tres enlaces-H entre átomos de mAb OMS858 y MASP-2:

Dador	MASP-2	N.º	átomo	Receptor	Cadena	N.º	átomo	Distancia
HIS	A	508	NE2	ASP	H	50	OD2	2,36
LYS	A	503	NZ	ASP	H	55	OD2	3,01
LYS	A	503	NZ	ASP	H	52	OD2	3,17

TABLA 16: 36 contactos de van der Waals entre átomos del mAb OMS858 y MASP-2.

mAb	Cadena	N.º	Átomo	MASP-2	Cadena	N.º	Átomo	distancia
ARG	L	30	CB	TRP	A	513	CZ2	3,34
TYR	L	31	CE2	TRP	A	513	CH2	3,83
ARG	L	30	CB	TRP	A	513	CE2	3,88
HIS	H	59	CD2	HIS	A	508	CD2	3,71
HIS	H	59	NE2	HIS	A	508	CD2	3,73
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CD2	3,81
HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CD2	3,82
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	CD2	3,75
ASP	H	50	OD2	HIS	A	508	CD2	3,23
TRP	L	90	CH2	HIS	A	508	NE2	3,83
HIS	H	59	CD2	HIS	A	508	NE2	3,69
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	NE2	3,34
HIS	H	59	CB	HIS	A	508	NE2	3,56
ASP	H	50	CG	HIS	A	508	NE2	3,41
TRP	L	90	CZ2	HIS	A	508	CE1	3,89
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CE1	3,88
HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CE1	3,22
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	CE1	3,33
HIS	H	59	CB	HIS	A	508	CE1	3,46
ASP	H	50	OD2	HIS	A	508	CE1	3,42
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	ND1	3,46
HIS	H	59	CG	HIS	A	508	ND1	3,70
HIS	H	59	NE2	HIS	A	508	CG	3,73
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CG	3,39

HIS	H	59	ND1	HIS	A	508	CG	3,52
HIS	H	59	CE1	HIS	A	508	CB	3,76
HIS	H	33	CE1	PRO	A	507	CD	3,72
HIS	H	33	ND1	PRO	A	507	CD	3,70
HIS	H	33	CE1	SER	A	506	CA	3,70
GLU	H	57	CB	LYS	A	503	NZ	3,1
ASP	H	55	CG	LYS	A	503	NZ	3,49
ASP	H	52	CB	LYS	A	503	NZ	3,86
ASP	H	55	OD2	LYS	A	503	CE	3,29
ASP	H	52	OD2	LYS	A	503	CE	3,57
ASP	H	52	OD2	LYS	A	503	CD	3,18
TYR	L	31	CE2	ASP	A	496	OD2	3,73

La FIGURA 13 ilustra las interacciones entre el paratopo del mAb OMS858 y el epítipo de MASP-2, según lo computado por el software LigPlot+, con la utilización del modo “Anticuerpos” configurado para los parámetros de cálculo del enlace de hidrógeno (3,35 Å de distancia máxima entre el dador y el receptor del enlace de hidrógeno y parámetros de contacto no unidos de hidrófobos a cualquier contacto, tales como las interacciones de van der Waals con una distancia de contacto máxima de 3,90 Å) con modelos derivados de las coestructuras de compuestos MASP-2 cristalográficos correspondientes. Los enlaces de hidrógeno y los contactos polares se presentan como líneas interrumpidas con las distancias en unidades ángstrom.

Se ilustran los átomos para los aminoácidos que interactúan con los átomos compuestos, así como los átomos compuestos que tienen suficiente densidad de electrones 2fo- σ c a partir de los datos cristalográficos. La numeración de los residuos de aminoácidos MASP-2 (N.º AA de MASP-2) obedece al código de acceso UniProt O00187, la numeración atómica de aminoácidos (átomo AA)

obedece a las convenciones establecidas por el Banco de Datos de Proteínas y ambas corresponden a aquellas presentadas en las TABLAS 15 y 16.

La numeración de los residuos de aminoácidos OMS858 obedece a la VH establecida como SEQ ID NO: 50 y la VL establecida como SEQ ID NO: 47. El paratopo OMS858, que incluye la región variable de cadena pesada (Asa H1, Asa H2) y la región variable de cadena ligera (Asa L3, Asa L1), se presenta por encima de la línea discontinua en la FIGURA 13 y el epítipo MASP-2 se presenta por debajo de la línea discontinua en la FIGURA 13. Algunos de los aminoácidos que se presentan en la FIGURA 13 cuentan con arcos con líneas radiantes, lo que indica que tienen interacciones van der Waals (líneas punteadas) con los átomos de otros aminoácidos. Los enlaces de hidrógeno y los contactos polares se presentan como líneas interrumpidas con las distancias en unidades ángstrom. Los átomos de carbono se presentan como círculos sólidos, los átomos de nitrógeno se presentan como círculos abiertos con una cruz y los átomos de oxígeno se presentan como círculos abiertos con una x. Las cadenas laterales de aminoácidos Glu57 y Arg30 de OMS858 se resolvieron solamente de manera parcial en la estructura de rayos X. Por consiguiente, es probable que haya más enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas de OMS858 entre la VH GLU57 y la VL ARG30 de OMS858 con residuos opuestos en MASP-2, debido a la cercanía de la cadena principal. Específicamente, la VL ARG30 de OMS858 puede formar un enlace iónico de MASP-2 con ASP496 y la VL ARG30 de OMS858 puede formar una interacción de apilamiento π - π con la porción aromática de TRP513 de MASP-2 y la VH GLU57 de OMS858 puede formar un enlace iónico o un enlace de hidrógeno con el grupo de amino de LYS503 de MASP-2.

Como se muestra en la FIGURA 13, OMS858 se une a MASP-2 mediante 3 enlaces H con residuos: ASP52 y ASP55 en la unión de la VH a LYS503 en MASP-2 y ASP50 en la unión de la VL a HIS508 en MASP-2. Como también se

muestra en la FIGURA 13, OMS858 se une a MASP-2 mediante los contactos van der Waals entre HIS33 de la VH con SER506 y PRO507 de MASP-2, ASP52, ASP55 y GLU57 de la VH con LYS503 de MASP-2, HIS59 y ASP50 de la VH con HIS508 de MASP-2, TRP90 de la VL con HIS508, ARG30 de la VL con TRP513 de MASP-2 y TYR31 de la VL con TRP513 y ASP496 de MASP-2.

En ciertos aspectos, el anticuerpo inhibidor de MASP-2 interactúa mediante los contactos van der Waals con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o todos los residuos de MASP-2, a continuación: SER506, PRO507, LYS503, HIS508, TRP513, ASP496 y combinaciones de estas. En ciertos aspectos, el anticuerpo inhibidor de MASP-2 interactúa mediante los enlaces de hidrógeno con 1 o 2 de los residuos de MASP-2, a continuación: LYS503 y HIS508.

La FIGURA 14A muestra la estructura tridimensional del epítipo de MASP-2 que comprende ASP496, LYS503, SER506, PRO507, HIS508 y TRP513, a los que se une OMS858. Como se muestra en la FIGURA 14A, el epítipo de MASP-2 denominado DIRMGTLKRLSPHYTQAW (SEQ ID NO: 6), que corresponde a los residuos de aminoácidos 496-513 de MASP-2 humano (SEQ ID NO: 1), se ubica en un único elemento antiparalelo de cadena beta-asa-cadena beta.

La FIGURA 14B muestra la estructura tridimensional del paratopo OMS858 que comprende HIS33, ASP50, ASP52, ASP55, GLU57 y HIS59 de la cadena pesada y ARG30, TYR31 y TRP90 de la cadena ligera a las que se une MASP-2. HIS33 se ubica en el asa H1. ASP50, ASP52, ASP55, GLU57, HIS59 forman un elemento antiparalelo de cadena beta-asa-cadena beta. TYR31 y ARG30 se encuentran en el asa 1 de la cadena ligera y TRP90 se encuentra en el asa L3 de la cadena ligera.

La FIGURA 15 muestra los contactos del epítopo MASP-2 DIRMGTLKRLSPHYTQAW (SEQ ID NO: 6) y la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de OMS858. En especial, como se muestra en la FIGURA 15, los residuos ASP55 de la región variable de cadena pesada, GLU57 y ASP52, interactúan con LYS503 de MASP-2 y los residuos HIS33, HIS59 y ASP50 de la región variable de cadena pesada interactúan con SER506, HIS508 y PRO507 de MASP-2. Como también se muestra en la FIGURA 15, el residuo TRP90 de la región variable de cadena ligera interactúa con PRO507 y HIS508 de MASP-2 y los residuos ARG30 y TYR31 de la región variable de cadena ligera interactúan con ASP496 y TRP513 de MASP-2.

En ciertos aspectos, los residuos aminoácidos SP 496-513 de MASP-2 de SEQ ID NO: 1 (DIRMGTLKRLSPHYTQAW denominado SEQ ID NO: 6) interactúan con OMS858 a través de las interacciones van der Waals. Las interacciones van der Waals incluyen las fuerzas de atracción electrostáticas débiles y de corto alcance entre las moléculas sin cargas que surgen de la interacción de los momentos permanentes o transitorios de dipolo eléctrico.

Como se muestra en la TABLA 16, el átomo CB de ARG30 LC OMS858 interactúa con los átomos CZ2 y CE2 de MASP-2 en TRP513. El átomo CE2 de TYR31 LC interactúa con el átomo CH2 de MASP-2 en TRP513. Los átomos CD2, NE2, CE1, ND1 y CG de HIS59 HC interactúan con el átomo CD2 de MASP-2 en HIS508. El átomo OD2 de ASP50 HC interactúa con el átomo CD2 de MASP-2 en HIS508. El átomo CH2 de TRP90 LC interactúa con el átomo NE2 de MASP-2 en HIS508. Los átomos CD2, CG y CB de HIS59 HC interactúan con el átomo NE2 de MASP-2 en HIS508. El átomo OD2 de ASP50 HC interactúa con los átomos CD2 y CE1 de MASP-2 en HIS508. El átomo CZ2 de TRP90 LC interactúa con el átomo CE1 de MASP-2 en HIS508. Los átomos CE1, ND1, CG, CB y OD2 de HIS59 HC interactúan con el átomo CE1 de MASP-2 en HIS508. Los átomos CE1 y CG de HIS59 HC interactúan con el átomo ND1 de MASP-2

en HIS508. Los átomos NE2, CE1 y ND1 de HIS59 HC interactúan con el átomo CG de MASP-2 en HIS508. El átomo ND1 de HIS59 HC interactúa con el átomo CG de MASP-2 en HIS508. El átomo CE1 de HIS59 HC interactúa con el átomo CB de MASP-2 en HIS508. El átomo CG de ASP50 HC interactúa con el átomo NE2 de MASP-2 en HIS508. Los átomos CE1 y ND1 de HIS33 HC interactúan con el átomo CD de MASP-2 en PRO507. El átomo CE1 de HIS33 HC interactúa con el átomo CA de MASP-2 en SER506. El átomo CB de GLU57 HC interactúa con el átomo NZ de MASP-2 en LYS503. El átomo CG de ASP55 HC interactúa con el átomo NZ de MASP-2 en LYS503. El átomo CB de ASP52 HC interactúa con el átomo NZ de MASP-2 en LYS503. El átomo OD2 de ASP55 HC interactúa con el átomo CE de MASP-2 en LYS503. El átomo OD2 de ASP52 HC interactúa con los átomos CE y CD de MASP-2 en LYS503. El átomo CE2 de TYR 31 LC interactúa con el átomo OD2 de MASP-2 en ASP496.

Para resumir, el análisis estructural del cristal del anticuerpo inhibidor OMS858 de MASP-2 muestra que este anticuerpo se une a un epítipo novedoso,⁴⁹⁶DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO: 6) en el dominio de la serina proteasa de MASP-2 humano. Se considera que este dominio de unión del epítipo es diferente de la región de la tríada activa de la serina proteasa (residuos HIS483, ASP532 y SER633). También se señala la superposición entre el epítipo novedoso ⁴⁹⁶DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO: 6) en el dominio de la serina proteasa de MASP-2 humano y el lugar de interacción C4 en MASP-2, que incluye los residuos LYS503 y TRP513 (véase Kidmose *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 109:15425 (2012)). Por lo tanto, los residuos LYS503 y TRP513 de MASP-2 humano pueden unirse para estar involucrados en la unión de OMS858 y de C4.

El ordenamiento de mAb OMS858 con MASP-2, como se describe en las FIGURAS 11-15, cumple con el formato de reconocimiento de anticuerpos y antígenos estándar y sugiere un mecanismo de acción donde la actividad de la

vía de la lectina se inhibe mediante la competencia de OMS858 con C4 en la unión con MASP-2.

Aunque solamente se realizó este análisis estructural del cristal para el complejo MASP-2-Fab mAb OMS858, como se demostró en el Ejemplo 6, no solo hay competencia cruzada del mAb OMS850 progenitor con OMS858, como se esperaba, sino que también hay competencia cruzada del mAb OMS860 y mAb OMS870 con OMS858. Por lo tanto, la unión de los epítomos OMS860 y OMS870 es igual o se superpone con el epítomo de la serina proteasa de MASP-2 identificada en el análisis del complejo MASP-2-Fab mAb OMS858. En cambio, no hay competencia cruzada de los anticuerpos inhibidores 4A8 y OMS721 de MASP-2 con OMS858 y, por lo tanto, se une un epítomo distinto en MASP-2.

Ejemplo 10

Generación de MASP-2 humana similar a la de perro para analizar la función deHIS508 en la unión con OMS858

Como se describe en el Ejemplo 9, la observación estructural del complejo MASP-2/OMS858 muestra que HIS508 es una cadena lateral fundamental del epítomo de unión, ya que interactúa tanto con la cadena pesada como con la cadena ligera del dominio variable de OMS858, a través de un puente H hacia ASP50 e interacción pi con TRP90 y HIS59.

La FIGURA 16 representa una alineación de aminoácidos de los dominios de la serina proteasa (SP) de MASP-2 en MASP-2 humana (AA 445 a 686 de la SEQ ID NO: 1); MASP-2 de macaco cangrejero (AA 445 a 686 de la SEQ ID NO: 4); MASP-2 de perro (AA 445 a 686 de la SEQ ID NO: 5); MASP-2 de ratón (AA 444 a 685 de la SEQ ID NO: 2) y MASP-2 de rata (AA 444 a 685 de la SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 1: MASP-2 humana (NP_006601.2)

MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAP
PGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQESTDTERAPGKDT
FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDIDECQVAPGEAPTCDHHCHN
HLGGFYCSCRAGYVLHRNKRTCSALCSGQVFTQRSGELSSPEYPRPYPKLSS
CTYSISLEEGFSVILDFVESFDVETHPETLCPYDFLKIQTDRREEHGPFCGKTLP
HRIETKSNTVTITFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHVSPVQAK
YILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPD
DLPSGRVEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSK
GEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTAAGALLY
DNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHD
AGFDNDIALIKLNNKVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFL
ARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLES GGKDCSRGDS
GGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF

SEQ ID NO: 2: MASP-2 de ratón (NP_001003893.1)

MRLLI FLGLLSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYADHQDRSWTLTAPP
GYRLRLYFTHFDLELSYRCEYDFVKLSSGTKVLATLCGQESTDTEQAPGNDTF
YSLGPSLKVTFHSDYSNEKPFTGFEAFYAAEDVDECRVSLGDSVPCDHYCHN
YLGYYCSCRAGYVLHQNKHTCSALCSGQVFTGRSGYLSSPEYPQPYPKLS
SCTYSIRLEDGFSVILDFVESFDVETHPEAQCPYDSLKIQTDKGEHGPFCGKTLP
PPRIETDSHKVTITFATDESGNHTGWKIHYTSTARPCPDPTAPPNGSISPVQAI
YVLKDRFSVFCKTGFE LLQGSVPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPECSIIDCGPP
DDL PNGHV DYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADGFWTSSK
GEKLPPVCEPVCGLSTHTIGGRIVGGQPAKPGDFPWQVLLL GQTTAAAGALIH
DNWVLTAAHAVYEKRMAASSLNIRMGILKRLSPHYTQAWPEEIFIHEGYTHGA
GFDNDIALIKLKNKVTINGSIMPVCLPRKEAASLMRTDFTGT VAGWGLTQKGLL
ARNLMFVDIPIADHQKCTAVYEKLYPGVRVSANMLCAGLETGGKDCSRGDSG
GALVFLDNETQRWFVGGIVSWG SINC GAADQYGVYTKVINYIPWIENIISNF

SEQ ID NO: 3: MASP-2 de rata (NP_742040.1)

MRLIVLGLLWSLVATLLGSKWPEPVFGRLVSPGFPEKYGNHQDRSWTLTAP
PGFRLRLYFTHFNLELSYRCEYDFVKLTSGTKVLATLCGQESTDTERAPGNDT
FYSLGPSLKVTFHSDYSNEKPFTGF EAFYAAEDVDECRTSLGDSVPCDHYCH
NYLGGYYCSCRVG YILHQNKHTCSALCSGQVFTGRSGFLSSPEYPQYPKLS
SCAYNIRLEEGFSITLDFVESFDVEMHPEAQCPYDSLKIQTDKREYGPFCGKTL
PPRIETDSNKVTITFTTDESGNHTGWKIHYTSTAQPCPDPTAPPNGHISPVQAT
YVLKDSFSVFCKTG FELLQGSVPLKSFTAVCQKDGSWDRPIECSIIDCGPPD
DLPNGHVDYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMSSNGKYVCEADGFWTSSKG
EKSLPVCKPVCGLSTHTSGGRIIGGQPAKPGDFPWQVLLLGETTAAGALIHDD
WVLTAAHAVYGKTEAMSSLDIRMGILKRLSPHYTQAWPEAVFIHEGYTHGAGF
DNDIALIKLKNKVTINRNIMPICLPRKEAASLMKTDFVGT VAGWGLTQKGFLAR
NLMFVDIPIVDHQKCATAYTKQPYPGAKVTVNMLCAGLDAGGKDSCRGDSSG
ALVFLDNETQRWFVGGIVSWGSINCGGSEQYGVYTKVTNYIPWIENIINNF

SEQ ID NO: 4: MASP-2 de macaco cangrejero (XP_005544869.1) predicha

MRLLTLLGLLCGSVATPLGPKWPEPVFGRLASPGFPGEYANDQERRWTLTAP
PGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGHSTEDTERAPGNDT
FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF EAFYAAEDIDECQVAPGEAPACDHHCHN
HLGGFYCSCRVG YILHRNKRTCSALCSGQVFTQ RSGELSSPEYPQYPKLSS
CTYSIRLEEGFSVILDFVESFDVETHPETLCPYDFLKI QIDSEEHGPF CGKTLPR
RIETKSNTVTITFVTDESGDHTGWKIHYTSTAQPCPYPMAPPNGHLSPVQAKYI
LKDSFSIFCEPGYELLQGHLPLKSFAAVCQKDGSWDQPM PSCSIVDCGPPDD
LPSGRVEYITGPEVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKG
ERSPPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGSTAAGALLYD
NWWLTAAHAIYEQKHDASSLDIRLGALKRLSPHYTQAWAEAVFIHEGYTHDAG
FDNDIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGLLAR
NLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYSGGSVTANMLCAGLES GGKDSCRGDSSG
ALVFLDNETQRWFVGGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIKNIISNF

SEQ ID NO: 5: MASP-2 de perro (XP_544572.4)

MRLLLFLGLLCGWAAAAPGPAWSQPLFGRLASPGFPGAYANHQERRWALTA
PPGYRLRLYFTHFHLELSYLCEYDFVKLSSGTEVLATLCGQESTDTERAPGND
TFRSPGSSLDVTFRSDYSNEQPFTGFYAAEDIDECQVSPGEAPPCDHHC
HNHLGGFYCSCRQGYVLHRNKRTCSALCAGQVFTGRSGVLSSPEYPQPYPK
LSSCTYSIRLEEGFSIVLDFVAPFDVESHDPDALCPYDSLQVRTDKEEYGPFCGT
TLPRRIETQSSAVAISFVTDQSGEHAGWRIRYSSSARPCSPVAPPNGRITPV
QAEYVLEDRVAVSCDPGYELLRGSSALESFTAVCQRDGSWDQPPPRCSAVD
CGPPDDLPAGRVDFLTGPGVTTYGAGIRYHCDGSFYAMTAGDGKYVCEADG
FWTSSKGEKSPPVCEPVCVSTRTTEGRIYGGQKAKLGDFPWQVLLLGRTTA
AGALLRDNWILTAHAVYTQKAAASSLDIRMGALKRLSAQYTQARAEAFIHEG
YTPDAGFDNDIALIKLKNRVVINSNVLPICLPRKEAESFMRSEDIGTASGWGLT
QRGFLARHLMFVDIPIVDHQKCTAAYEKLSTYPGGRVTENMLCAGLEGGGKDS
CRGDSGGALVFLDNETQRWVVGIVSWGSTNCGEANQYGVYTKVINIPIWIE
NIINNF

Las proteínas MASP-2 recombinantes del macaco cangrejero y del ratón se produjeron para evaluar la reactividad cruzada entre especies del anticuerpo de OMS858. La codificación del ADN de un fragmento catalítico (dominios CCP1-CCP2-SP) de MASP-2 humana se amplificó por PCR mediante la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (New England BioLabs) y se clonó al vector pET-17b (Novagen) con el kit de clonación de alta definición In-Fusion (Clontech). Se agregó una etiqueta 6xHis al C-terminal del polipéptido para purificación. También se crearon constructos de expresión de MASP-2 de macaco cangrejero similares.

Además, también se produjo una variante “de semejanza al perro” de MASP-2 humana. Se observó que OMS858 no inhibe la activación de la vía de la lectina en el suero canino (no se muestran los datos). Como se muestra en la FIGURA 16, las secuencias de la MASP-2 de perro y la MASP-2 humana varían. Se

observa una de estas variaciones en los residuos que corresponden a HIS508 en MASP-2 humana, que es una glutamina en la MASP-2 canina. Se predice que la glutamina en la MASP-2 canina interactuaría bien con solamente uno de los dos aminoácidos del paratopo con el que la histidina de la MASP-2 humana interactúa, lo que debilitaría la interacción entre la MASP-2 canina y OMS858, en comparación con la MASP-2 humana. Para generar una variante de semejanza a la canina de la MASP-2 humana, se introdujo una mutación de H508Q mediante una mutagénesis sitio-dirigida con base en PCR con polimerasa de ADN HS de fusión PfuUltra II (Agilent). Según los datos de la estructura cristalina, se esperaba que OMS858 tuviera una afinidad menor con esta mutación H508Q de MASP-2, en comparación con la H508 humana de tipo natural.

Todos los constructos de expresión se transformaron en *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen), se expresaron las proteínas recombinantes de acuerdo con el protocolo de fabricación y se purificaron mediante una cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC) con una columna de níquel. Se evaluaron la integridad proteica y la actividad enzimática de las proteínas purificadas mediante SDS-PAGE y un ensayo de escisión del péptido, respectivamente.

Se aplicó una interferometría de capa biológica (BLI) para analizar la unión del anticuerpo de OMS858 a varias proteínas MASP-2. Todas las mediciones se realizaron con el sistema RED96 de Octet (ForteBio) con PBS que contenía BSA al 1% y Tween-20 al 0,02% como tampón de ensayo. Primero, se cargó OMS858 (50 nM) en biosensores de captura de Fc antihumanos (ForteBio). Después de un paso inicial, los sensores capturados se sumergieron en pocillos que contenían distintas concentraciones de las proteínas objetivo (1,6 nM-50 nM) para el paso de asociación (120 s) y luego se transfirieron a pocillos vacíos para el paso de disociación (200 s). En todos los experimentos, el sensor capturado también se sumergió en un pocillo que no contenía ningún analito, para permitir

que la sustracción de referencia única compensara la disociación natural del anticuerpo capturado. Se analizaron los sensorgramas de unión registrados con software de análisis de datos de Octet (ForteBio) para determinar la afinidad de unión (KD).

TABLA 17: Unión de OMS858 a MASP-2

Proteína MASP-2	OMS858 KD
CCP1/CCP2/SP de MASP-2 humana	4,52 nM
CCP1/CCP2/SP H508Q de MASP-2 humana “similar a la de perro”	~2 uM
MASP-2 de macaco cangrejero CCP1/CCP2/SP	8,23 nM
MASP-2 de ratón CCP1/CCP2/SP	32,9 nM

Como se presenta en la TABLA 17, la MASP-2 humana con la mutación de H508Q “de semejanza al perro” redujo la afinidad de unión por, aproximadamente, 450 veces.

Ejemplo 11

Estudios del macaco cangrejero: PK/PD de OMS856 y OMS858

Los macacos cangrejeros sin tratamiento previo (n = 3) recibieron 1,5 mg/kg de OMS856 OMS858, ya sea por vía i.v. o subcutánea. Se obtuvieron muestras de sangre de cada animal en el Día -7 y luego a las 0,083, 1, 4, 24, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840 y 1008 horas después de la dosis, las cuales se analizaron en busca de actividad de la vía de la lectina y para evaluar la cantidad de anticuerpos administrados.

El ensayo de la vía de la lectina se realizó en placas de ELISA recubiertas con 5 µg/mL de manano que se conservaron así durante la noche a 4 °C. Luego, las placas se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. El suero de macaco cangrejero se diluyó dos veces en PBS, se agregó a pocillos recubiertos de manano y se incubó a 4 °C durante 14 minutos. Después de esto, las placas se lavaron tres veces en PBS/Tween 20 y se investigó el depósito de C4 con C4c antihumana de conejo (Dako) y luego se añadió HRP de α-Conejo de cabra (Southern Biotech).

La FIGURA 17A y la FIGURA 17B ilustran de manera gráfica la actividad de la vía de la lectina de los macacos cangrejeros frente al tiempo, luego de la administración i.v. de 1,5 mg/kg de OMS856 o OMS858, respectivamente.

La FIGURA 18A y la FIGURA 18B ilustran de manera gráfica la actividad de la vía de la lectina de los macacos cangrejeros frente al tiempo, luego de la administración subcutánea de 1,5 mg/kg de OMS856 o OMS858, respectivamente.

Como se muestra en la FIGURA 17A y la FIGURA 18A, los macacos cangrejeros presentan una inhibición de la vía de la lectina sistémica y sostenida luego de la administración i.v. y subcutánea de 1,5 mg/kg de OMS856.

Como se muestra en la FIGURA 17B y la FIGURA 18B, los macacos cangrejeros presentan una inhibición de la vía de la lectina sistémica y sostenida luego de la administración i.v. y subcutánea de 1,5 mg/kg de OMS858.

Ejemplo 12

Análisis de OMS858 en un Modelo de Trombosis en Ratones

Se llevó a cabo un estudio para determinar la dosis mínima eficaz y el efecto máximo de OMS858 en el modelo de oclusión de la arteria carótida inducida con cloruro férrico en ratones.

La arteria carótida izquierda del ratón macho C57B1/6 se expuso y se instaló un sensor de flujo en miniatura (0,7 mm) de Transonic alrededor del vaso. Después de la administración del compuesto de prueba, se indujo la formación de trombos mediante la aplicación de un trozo de papel de filtro (1,5 mm x 1 mm) saturado con 3,5% de FeCl_3 . El papel de filtro se colocó directamente sobre la arteria carótida en contacto con la superficie adventicia del vaso. Luego de 3 minutos de exposición, se retiró el papel de filtro y se lavó el vaso con solución salina. Se registró el flujo sanguíneo en la carótida de manera continua hasta que el vaso estuvo obstruido por completo o durante un periodo máximo de 45 minutos. El tiempo hasta la oclusión (TTO) se definió como el tiempo desde la aplicación de FeCl_3 hasta que el flujo sanguíneo bajó a menos de 0,1 mL/min durante, al menos, 30 segundos o hasta que la amplitud de la señal disminuyó tanto que el sensor ya no podía visualizar los latidos. Los vasos sin oclusión al finalizar el periodo de observación de 45 minutos recibieron un puntaje de 45 min de TTO.

A los ratones (n=8 para cada grupo de dosis) se les administró OMS858 por inyección sc 24 horas antes del estudio en las siguientes dosis: 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg. Se utilizó como control positivo el ácido acetilsalicílico (ASA) a 30 mg/kg administrado una hora antes de la provocación con FeCl_3 . Se utilizó un anticuerpo no relacionado como control negativo.

Los resultados se muestran en la TABLA 18 y se ilustran gráficamente en la FIGURA 19. Como se muestra en la TABLA 18 y en la FIGURA 19, el efecto máximo de OMS858 fue comparable al del ASA. Como se muestra además en la TABLA 18 y la FIGURA 19, OMS858 fue eficaz en la dosis de prueba más baja (1 mg/kg). El TTO en los ratones de control tratados con vehículo fue de

14,7 ± 4,6 minutos. Como se esperaba, el pretratamiento con ASA prolongó significativamente el TTO hasta 36,4 ± 5,7 minutos, mientras que el pretratamiento con el anticuerpo de control de isotipo no prolongó significativamente el TTO (9,3 ± 1,5 minutos), lo que confirma la idoneidad del sistema de prueba. El pretratamiento de los ratones con OMS858 a dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/kg prolongó significativamente el TTO (40,4 ± 4,6, 37,0 ± 5,2, 39,1 ± 3,9 minutos y 37,4 ± 5,0, respectivamente) en comparación con el grupo del vehículo. No se observó una clara relación dosis-respuesta entre las dosis de OMS858 evaluadas, lo que indica que el efecto farmacológico máximo podría alcanzarse a una cantidad de dosis de 1 mg/kg SC en este modelo de ratón.

TABLA 18: Tiempo hasta la oclusión de la arteria carótida tras una lesión vascular inducida por FeCl₃

Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	TTO (minutos) Media ± SEM	N	Valor p frente a Vehículo
Vehículo	-	14,7 ± 4,6	8	-
ASA	30	36,4 ± 5,7*	8	0,010
OMS858	1	40,4 ± 4,6*	8	0,002
OMS858	3	37,0 ± 5,2*	8	0,006
OMS858	10	39,1 ± 3,9*	8	0,001
OMS858	30	37,4 ± 5,0*	8	0,005
Control de isotipo	10	9,3 ± 1,5	8	0,286

* p <0,05 en comparación con el control con vehículo; los valores p se generaron utilizando una prueba t desapareada unilateral; ASA=Aspirina; N=número de ratones/grupo de tratamiento; SEM=error estándar de la media; TTO=tiempo hasta la oclusión

Ejemplo 13

Efecto de OMS858 en la vía clásica, de lectina y alternativa inducida por activación de C5b-9 en suero humano

Para evaluar la selectividad funcional de la inhibición de la vía de la lectina por OMS858 se utilizó el kit de cribado del sistema del complemento de Wieslab®. La actividad funcional de OMS858 se evaluó mediante la preincubación de muestras de suero humano con OMS858 diluido en serie, seguida de la activación del complemento en condiciones de ensayo específicas de la vía y la cuantificación de la deposición de C5b-9.

Las muestras de suero humano diluidas en tampones de ensayo específicos de la vía se preincubaron con diluciones seriadas de OMS858, seguidas de la incubación en los pocillos de ensayo Wieslab® apropiados, precubiertos con activador del complemento específico de la vía clásica (A), específico de la vía de la lectina (B) o específico de la vía alternativa (C) durante 1 hora a 37 °C. La deposición del producto de activación terminal del complemento C5b-9 (también denominado MAC) se cuantificó utilizando un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina específico para el neoantígeno C5b-9.

Como se muestra en las FIGURAS 20A-20C, OMS858 inhibió la activación de C5b-9 inducida por la vía de la lectina con un valor IC₅₀ de 0,81 nM (121,5 ng/mL) sin afectar a la activación de C5b-9 inducida por la vía clásica o alternativa a concentraciones de hasta 500 nM.

Ejemplo 14

Otra caracterización de la unión del anticuerpo monoclonal OMS858 a MASP-2 humana

Se utilizó la resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_{on} y k_{off} ,

respectivamente) para la interacción del zimógeno en fase fluida y las formas catalíticamente activas de MASP-2 humana con OMS858 inmovilizado. Se utilizaron metodologías y series de concentración optimizadas para una caracterización detallada de la interacción, y las constantes de velocidad obtenidas se utilizaron para calcular la constante de equilibrio de disociación (K_D) para la interacción OMS858-MASP-2.

El k_{on} y el k_{off} para la unión catalíticamente activa de MASP-2 a OMS858 fueron $3,38 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $9,71 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ respectivamente, lo que arroja un valor de K_D de 287pM. El k_{on} y el k_{off} para la unión de zimógeno MASP-2 a OMS858 fueron de $2,41 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $1,72 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ respectivamente, lo que arroja un valor de K_D de 715pM. Véase la TABLA 19.

TABLA 19: Unión de OMS858 con zimógeno y las formas activas de MASP-2 humana

Forma MASP-2	$k_{on} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{off} (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{pM})$
MASP-2 catalíticamente activo	$3,38 \times 10^7$	$9,71 \times 10^{-3}$	287
Zimógeno MASP-2	$2,41 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-4}$	715

La especificidad de unión de OMS858 para MASP-2 se evaluó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La MASP-2 humana recombinante o C1r, C1s, CFD, MASP-1 y MASP-3 se inmovilizaron en placas de poliestireno, y se midió la dosis-respuesta de la unión de OMS858. La constante de disociación aparente (K_D) se estimó mediante regresión no lineal utilizando un modelo logístico de 4 parámetros.

Se probaron dos lotes diferentes de OMS858. La KD aparente media de la unión de OMS858 a la MASP-2 humana fue de 0,047 µg/mL. No se observó ninguna unión significativa a C1r, C1s, MASP-1, MASP-3 o al factor D en concentraciones de OMS858 de hasta 100 µg/mL, lo que indica que OMS858 tiene una selectividad de pliegues de al menos 2000 veces para MASP-2 sobre las serina proteasas estrechamente relacionadas del sistema del complemento. La selectividad de pliegues se calculó como K_D (serina proteasa relacionada) / K_D media (MASP-2). Véase la TABLA 20.

TABLA 20: Selectividad de la unión de OMS858 a MASP-2 en comparación con las serina proteasas relacionadas del sistema del complemento

	Valores KD aparentes de la unión de OMS858 [ug/mL]					
	MASP-2	MASP-1	MASP-3	C1r	C1s	CFD
lote N.º 1	0,042	>100	>100	>100	>100	>100
lote N.º 2	0,051	>100	>100	>100	>100	>100
Media	0,047	>100	>100	>100	>100	>100
Selectividad de pliegues		>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Ejemplo 15

Caracterización de la actividad funcional del anticuerpo monoclonal OMS858 en varias especies de mamíferos

Se utilizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que mide la activación de C4 dependiente de lectina en suero al 50% para caracterizar la potencia funcional de OMS858 en suero de humano, mono macaco cangrejero, perro, conejo y en plasma de hirudina de ratón. La actividad funcional de

OMS858 se evaluó mediante la preincubación de muestras de suero o plasma de hirudina de las respectivas especies con OMS858 diluido en serie, seguida de la adición de la mezcla a pocillos de placa ELISA recubiertos de manano que impulsan la activación de C4 dependiente de lectina *in vitro*. La potencia funcional de la inhibición por OMS858 de la actividad de MASP-2 se estimó analizando la curva concentración-respuesta de la inhibición de la vía de la lectina y determinando el valor IC₅₀.

En suero humano, OMS858 demostró una potente inhibición de la activación del complemento dependiente de la lectina, con un valor IC₅₀ medio de 1,09 nM (164 ng/mL). Los valores medios de IC₅₀ de OMS858 para la inhibición de la activación de la vía de la lectina medidos en suero de mono macaco cangrejero y plasma de ratón fueron de 44,1 nM (6,620 µg/mL) y 11,9 nM (1,79 µg/mL), respectivamente. Por el contrario, OMS858 no inhibió de forma apreciable la activación del complemento dependiente de la lectina en sueros de conejo y perro a concentraciones de hasta 500 nM. Véase la TABLA 21. La comparación de las potencias funcionales del ratón y del mono macaco cangrejero con la del ser humano demostró que OMS858 tiene una potencia funcional 10,9 veces y 40,5 veces menor en estas especies en comparación con el ser humano, respectivamente. La potencia relativa al ser humano se calculó como la relación entre el valor de la IC₅₀ de las especies de consulta y la IC₅₀ obtenida con suero humano. Véase la TABLA 22.

TABLA 21: Valores IC₅₀ para la inhibición de la vía de la lectina por OMS858 en suero de ratón, conejo, perro y mono macaco cangrejero en comparación con el humano

Valor IC ₅₀ (nM)				
Humano	Ratón	Conejo	Perro	Macacos cangrejeros

Experimento 1	0,89	9,59	>500	>500	42,8
Experimento 2	0,86	11,2	>500	>500	44
Experimento 3	1,52	14,8	>500	>500	45,5
MEDIA	1,09	11,9	N/A	N/A	44,1

TABLA 22: Potencias en todas las especies en relación con el ser humano

Especies de prueba	Valor (IC ₅₀ -Consulta/ IC ₅₀ -Humano)
Humano	1
Ratón	10,9
Conejo	N/A
Perro	N/A
Mono	40,5

Ejemplo 16

Farmacodinámica de OMS858 en el ratón y mono macaco cangrejero

La actividad PD (inhibición de la actividad de la vía de la lectina) se midió tras la exposición *ex vivo* del suero a una superficie recubierta de manano, seguida de la evaluación de la activación del complemento mediante un inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA). En ratones, se comparó la deposición individual de fragmentos de activación del complemento en animales con la deposición media de fragmentos de activación del complemento en muestras recogidas en animales de valor inicial/control y los datos se presentaron como porcentaje de inhibición. En los monos, los datos de deposición individual de C4 se compararon con la respuesta de valor inicial del animal individual y se presentaron como porcentaje de inhibición.

Los resultados de los ratones se muestran en la FIGURA 24. Hubo una alta variabilidad en la actividad de LP de valor inicial en los ratones, medida por el ECLIA. No hubo un efecto detectable de DP a 0,1 mg/kg. Sin embargo, la inhibición media de MASP-2 fue superior al 50% hasta 72 horas después de la dosis en el grupo de dosis de 0,3 mg/kg SC, hasta 504 horas después de la dosis en el grupo de dosis de 1 mg/kg I.V., y hasta 1008 horas después de la dosis en los grupos de dosis de 1 y 3 mg/kg SC. Además de la tendencia al aumento de la duración del efecto con el aumento de la cantidad de la dosis, hubo una tendencia al aumento de la inhibición de la MASP-2 con concentraciones más altas de OMS858. Las concentraciones de OMS858 superiores a 6 µg/mL (alcanzadas en los grupos de dosis de 1 mg/kg I.V. y SC y 3 mg/kg SC) condujeron sistemáticamente a una inhibición de MASP-2 superior al 50%. Estos datos sugieren que OMS858 a cantidades de dosis de 1 mg/kg y superiores logra sistemáticamente una inhibición sustancial de la actividad de MASP-2 en ratones durante un periodo prolongado.

A los monos macacos cangrejeros macho (n=3/grupo) se les administró 0,1, 0,3, 1 o 3 mg/kg de OMS858 por inyección subcutánea (SC) o 1 mg/kg por inyección intravenosa (I.V.). Se recogieron muestras de suero para determinar la concentración de OMS858 y la actividad farmacodinámica de OMS858 antes de la dosis y a las 0,083, 1, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848 y 2016 horas después de la dosis.

Los resultados de los monos se muestran en la FIGURA 21. Se observó una inhibición de aproximadamente el 70-80% de la actividad de la vía de la lectina a partir de las 24 h a 48 h después de la administración de OMS858 y durante aproximadamente 336 horas después de la dosis en monos macacos cangrejeros a los que se administró OMS858 a 1 mg/kg SC, seguida de una disminución gradual de la inhibición con el tiempo. Se observó una inhibición casi

completa (>95%) de la actividad de la vía de la lectina a partir de ~24 h después de la administración de OMS858 y durante aproximadamente 672 h después de la dosis, seguida de una disminución gradual de la inhibición con el tiempo en monos macacos cangrejeros a los que se les administró 3 mg/kg de OMS858 SC. También se observó una inhibición casi completa de la actividad de la vía de la lectina tras la administración I.V. de OMS858 a 1 mg/kg, con una duración del efecto máximo y una disminución gradual con el tiempo similares a las observadas con 1 mg/kg SC.

Hubo una relación coherente entre las concentraciones séricas de OMS858 y la actividad de la EP en los monos macacos cangrejeros, de modo que las concentraciones séricas de OMS858 por encima de aproximadamente 20 µg/mL dieron lugar a un alto grado (>80%) de inhibición de la actividad de la vía de la lectina, mientras que las concentraciones séricas por debajo de aproximadamente 3 µg/mL dieron lugar a una inhibición mínima. La modelización de la concentración sérica de OMS858 y los datos de la respuesta a PD indicaron un perfil sigmoidal de concentración-respuesta del fármaco con un valor EC₅₀ (concentración de OMS858 que da lugar a una inhibición de la vía de la lectina medio-máxima) de aproximadamente 9µg/mL. Véase la FIGURA 22.

Ejemplo 17

Farmacodinámica de OMS858 en ratones y monos macacos cangrejeros

Se caracterizó la PK de OMS858 tras una administración única SC de 0,1, 0,3, 1 o 3 mg/kg o una administración única IV en bolo de 1 mg/kg en ratones CD-1 macho y en monos macacos cangrejeros macho. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosis y a las 0,083 (solo IV), 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176 y 1344 horas después de la dosis en ratones (N=3/grupo/punto temporal; muestreo terminal), así como antes de la dosis y aproximadamente a las 0,083, 1, 4, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 504, 672, 840,

1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848 y 2016 horas después de la dosis en monos. (N=3/grupo/punto temporal; muestreo en serie).

En la TABLA 23 se muestra un resumen de los parámetros PK medidos tras una única administración de OMS858 por inyección SC o I.V. a ratones y monos. En la FIGURA 23 se muestran los gráficos de la concentración sérica media de OMS858 a lo largo del tiempo tras una única administración I.V. o SC a ratones (panel izquierdo) y a monos (panel derecho).

Tras una única administración SC, la mediana del tiempo en que se alcanzó la concentración máxima ($t_{\text{máx}}$) fue de 24 a 168 horas después de la dosis en ratones y de 72 a 168 horas después de la dosis en monos. Tras una única administración SC o I.V., el $t_{1/2}$ de eliminación de OMS858 fue de 203 a 409 horas en ratones y de 196 a 487 horas en monos. La concentración máxima observada ($C_{\text{máx}}$) y la exposición total (área bajo la curva de concentración temporal extrapolada al infinito [AUC_{INF}]) aumentaron en general con la dosis de forma proporcional en ratones y monos. La biodisponibilidad determinada mediante la exposición total (AUC_{INF}) tras una única administración SC de 1 mg/kg de OMS858 fue del 85,7% en ratones y del 93,0% en monos.

TABLA 23: Parámetros farmacocinéticos tras la administración única de OMS858 por inyección SC e I.V. a ratones y monos

Especie	Parámetro	0,1 mg/kg SC	0,3 mg/kg SC	1,0 mg/kg SC	3,0 mg/kg SC	1 mg/kg I.V.
Ratón ^a	C_0 (µg/mL) ^b	NA	NA	NA	NA	24,3
	$t_{\text{máx}}$ (h)	24,0	168	72,0	72,0	0,0830
	$C_{\text{máx}}$ (µg/mL)	1,19	2,54	8,54	23,1	24,3

Especie	Parámetro	0,1 mg/kg SC	0,3 mg/kg SC	1,0 mg/kg SC	3,0 mg/kg SC	1 mg/kg I.V.
	C _{máx} /Dosis (µg/mL)/(mg/kg)	11,9	8,47	8,54	7,71	24,3
	AUC _(0-336h) (h*µg/mL)	282	716	2170	6040	2570
	AUC _(0-336h) /Dosis (h*µg/mL)/(mg/kg)	2820	2390	2170	2010	2570
	T _{último} (h)	1340	1340	1340	1340	1340
	AUC _(0-t) (h*µg/mL)	519	1220	4540	14.100	5300
	AUC _{INF} (h*µg/mL)	526	1230	4810	16.000	5610
	t _{1/2} (h)	197	167	291	409	296
	CL (mL/h/kg) ^b	NA	NA	NA	NA	0,178
	V _{ss} (mL/kg) ^b	NA	NA	NA	NA	89,6
	Biodisponibilidad ^c	NA	NA	85,7%	NA	NA
Mono^d	C ₀ (µg/mL) ^b	NA	NA	NA	NA	35,8
	t _{máx} (h)	160	192	168	104	8,06
	C _{máx} (µg/mL)	1,53	6,01	17,9	54	37,2
	C _{máx} /Dosis (µg/mL)/(mg/kg)	15,3	20	17,9	18,0	37,2

Especie	Parámetro	0,1 mg/kg SC	0,3 mg/kg SC	1,0 mg/kg SC	3,0 mg/kg SC	1 mg/kg I.V.
	AUC _(0-336h) (h*µg/mL)	426	1630	4960	16.000	6030
	AUC _(0-336h) /Dosis (h*µg/mL)/(mg/kg)	4260	5440	4960	5320	6030
	T _{último} (h)	1620	1290	1060	2016	1620
	AUC _(0-t) (h*µg/mL)	1020	3100	9950	44.300	11.200
	AUC _{INF} (h*µg/mL)	1080	3160	10.600	47.800	11.400
	t _{1/2} (h)	343	196	225	487	259
	CL (mL/h/kg) ^b	NA	NA	NA	NA	0,0996
	V _z (mL/kg) ^b	NA	NA	NA	NA	29,3
	V _{ss} (mL/kg) ^b	NA	NA	NA	NA	36,7
	Biodisponibilidad ^c	NA	NA	93,0%	NA	NA

a Los parámetros séricos indicados para los ratones machos según los datos compuestos de concentración media frente al tiempo.

b Determinado para el grupo I.V. solo en la cantidad de dosis de 1 mg/kg.

c Biodisponibilidad=AUC_{INF} SC / AUC_{INF} I.V.

d Parámetros séricos medios indicados para los monos macho.

AUC_(0-336h)=área bajo la curva de tiempo-concentración de 0 a 336 horas posdosis; AUC_(0-336h) / Dosis=área normalizada por dosis bajo la curva de tiempo-concentración de 0 a 336 horas posdosis; AUC_(0-t)=área bajo la curva de tiempo-

concentración de 0 a t horas (último punto temporal medido); AUC_{INF} =área bajo la curva de tiempo-concentración extrapolada al infinito; C_0 =concentración estimada en el tiempo 0; $C_{máx}$ =concentración máxima observada; $C_{máx} / \text{Dosis}$ =concentración máxima observada normalizada por la dosis; h =horas; NA=no aplicable; SC=subcutánea; I.V.=intravenosa; $t_{1/2}$ =semivida terminal; $t_{último}$ =último punto temporal; $t_{máx}$ =tiempo en el que se alcanza la concentración máxima; V_{ss} =volumen de distribución en estado estacionario; V_z =volumen de distribución según la fase de eliminación terminal.

Ejemplo 18

Estudio clínico de fase 1 de dosis única de OMS858 en sujetos humanos sanos

Se lleva a cabo un estudio ciego de dosis única ascendente de administración intravenosa (I.V.) y subcutánea (SC) de OMS858 en sujetos sanos para evaluar la seguridad, tolerabilidad, PK, PD e inmunogenia en comparación con un placebo. 48 voluntarios humanos sanos en total se dividen en 6 cohortes de 8 sujetos cada una. En cada cohorte, se administra OMS858 a 6 sujetos y placebo a 2 sujetos. Tanto los sujetos como el personal médico que administra las dosis están cegados con respecto a qué sujetos reciben OMS858 y cuáles reciben placebo. La dosificación de las 6 cohortes es la siguiente

- Cohorte 1: dosis única I.V. de 0,01 mg/kg de OMS858 o placebo
- Cohorte 2: dosis única I.V. de 0,03 mg/kg de OMS858 o placebo
- Cohorte 3: dosis única I.V. de 0,1 mg/kg de OMS858 o placebo
- Cohorte 4: dosis única I.V. de 0,3 mg/kg de OMS858 o placebo
- Cohorte 5: dosis única SC de 1,0 mg/kg de OMS858 o placebo
- Cohorte 6: dosis única SC de OMS858 o placebo, dosis que se determinará en función de los datos de las cohortes anteriores

Los sujetos son hombres o mujeres sanos de entre 18 y 60 años con un peso de 50 a 110 kg y un índice de masa corporal de 18 a 30 kg/m² en el momento del cribado. Se toman muestras de sangre en el momento del cribado, en el día -1 antes de la administración, inmediatamente antes de la dosis, a las 0,5, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas después de la administración y en los días 15, 22, 29, 57 y 85 después de la administración. Los criterios de valoración primarios son la evaluación de la seguridad y la tolerabilidad de OMS858. Los criterios de valoración secundarios son la caracterización de la PK y la PD de OMS858 y la evaluación de la presencia de anticuerpos antifármaco (ADA) contra OMS858 después de su administración. El criterio de valoración exploratorio es el análisis del impacto de OMS858 en cantidades de MASP-2 y de lectina de unión a manano (MBL).

Las evaluaciones de seguridad y tolerabilidad incluyen la monitorización de eventos adversos, signos vitales, electrocardiograma, examen físico, análisis de muestras de sangre y orina para evaluaciones clínicas y otras mediciones del estado clínico. Las muestras de sangre y/o suero de los sujetos se ensayan para el análisis de la PK, análisis de la PD, según lo determinado por la inhibición de la vía de la lectina, medida por el ensayo de deposición de C4, cantidades de MASP-2, cantidades de MBL, ADA y otros biomarcadores relevantes.

Los datos provisionales de PK y PD para la cohorte 1, la cohorte 2, la cohorte 3 y la cohorte 4 se muestran en las FIGURAS 25-26. No se observaron problemas de seguridad o tolerabilidad en los puntos de tiempo mostrados en las FIGURAS 25-26. Las mediciones de PK para OMS858 mostraron una exposición proporcional a la dosis durante los puntos temporales mostrados en la FIGURA 25. Se observaron respuestas de PD sólidas y sostenidas para OMS858 en las tres cohortes, como se muestra en la FIGURA 26. Se observó una relación

PK/PD favorable, como se muestra en la FIGURA 27, con una EC₅₀ de 170 ng/mL y una EC₉₀ de 400 ng/mL, según los datos de las cohortes 1-3.

IX. Realizaciones ejemplares

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes mencionadas en esta memoria se incorporan en el presente documento como referencia.

Aunque se han ilustrado y descrito ciertas realizaciones de la invención, se apreciará que se pueden hacer varios cambios en estas sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, las diversas modificaciones de las realizaciones específicas descritas que son obvias para los expertos en los campos de la medicina, inmunología, farmacología o campos relacionados están previstas dentro del alcance de la invención.

En consecuencia, los siguientes apartados numerados que describen realizaciones específicas se proporcionan para mayor claridad, pero no deben interpretarse como una limitación de las reivindicaciones.

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno de este que se une específicamente a un epítipo situado dentro del dominio de la serina proteasa de la MASP-2 humana, donde dicho epítipo está situado dentro de los aminoácidos ₄₉₆DIRMGTLKRLSPHYTQAW₅₁₃ (SEQ ID NO:6), donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este inhibe la activación del complemento de la vía de la lectina.

2. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 1, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno compite con la unión de C4 a MASP-2.
3. El anticuerpo aislado, o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 1, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este forma un enlace de hidrógeno con al menos uno de los Lys 503 y/o His 508 de MASP-2 humana.
4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este forma un enlace de hidrógeno con la His 508 de MASP-2 humana.
5. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 1, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este forma un contacto de van-der-Waals con uno o más de los siguientes aminoácidos de MASP-2 humana: Asp 496, Lys 503, Ser 506, Pro 507, His 508 y Trp 513.
6. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 que tiene la secuencia NXXMH, donde X en la posición 2 es H o Y y donde X en la posición 3 es H o W; una HC-CDR2 presentada en la SEQ ID NO: 63 (DIDXSDSEXXYXXKFKD) donde X en la posición 4 es P o A; y donde X en la posición 9 es T o I, y donde X en la posición 10 es H o Y, y donde X en la posición 12 es I o N; y donde X en la posición 13 es E o Q; y una HC-CDR3 presentada en la SEQ ID NO: 18 (GDITTTLRIFYDV); y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una LC-CDR1 presentada en la SEQ ID NO:64 (SASSSVXYMY) donde X en la posición 7 es R o S; una LC-CDR2 presentada

en la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y una LC-CDR3 presentada en la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT); o

(b) una región variable de cadena pesada que comprende una HC-CDR1 presentada en la SEQ ID NO:25 (SYWMH), una HC-CDR2 presentada en la SEQ ID NO:27 (NINPSNGGTNCNEKFKN) y una HC-CDR3 presentada en la SEQ ID NO: 29 (WAYDAMDY) y una LC-CDR1 presentada en la SEQ ID NO:41 (RASESVDSYGNSFMH), una LC-CDR2 presentada en la SEQ ID NO:43 (FASNLES) y una LC-CDR3 presentada en la SEQ ID NO:45 (QQSNEDPLT).

7. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWMH).

8. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:56 (NYHMH).

9. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 57 (NHHMH).

10. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD).

11. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD).

12. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD).

13. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY).

14. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY).

15. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWMH); la SEQ ID NO:56 (NYHMH) o la SEQ ID NO:57 (NHHMH), la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) o la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

16. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) o la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

17. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:56 (NYHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) o la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

18. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:57 (NHHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD) o la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

19. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:16 (DIDPSDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

20. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

21. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:56 (NYHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:53 (DIDASDSETHYIEKFKD), y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTTLRYFDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY), la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS), y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

22. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:57 (NHHMH); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:53 ((DID~~A~~SDSETHYIEKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTLRIFYDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:32 (SASSSVRYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

23. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este del apartado 6(a), donde la HC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:14 (NYWM); la HC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:22 (DIDPSDSEIYYNQKFKD) y la HC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:18 (GDITTTLRIFYDV) y la LC-CDR1 comprende la SEQ ID NO:39 (SASSSVSYMY) la LC-CDR2 comprende la SEQ ID NO:34 (DTSNLAS) y la LC-CDR3 comprende la SEQ ID NO:36 (QQWSSYPLT).

24. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del apartado 6(a), donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:46, la SEQ ID NO:48, la SEQ ID NO:49 o la SEQ ID NO:50 y una cadena ligera que comprende al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO:47.

25. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del apartado 6(a), donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:46, la SEQ ID NO:48, la SEQ ID NO:49 o la SEQ ID NO:50 y una cadena ligera que comprende al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:47.

26. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del apartado 6(a), donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una

cadena pesada que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:8 y una cadena ligera que comprende al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:11.

27. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del apartado 6(b), donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este comprende una cadena pesada que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:9 y una cadena ligera que comprende al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:12.

28. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 27, 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 antígeno de cualquiera de los anteriores.

29. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 27, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de 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.

30. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 27, que comprende además una región constante de inmunoglobulina.

31. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 27, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este está humanizado.

32. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 27, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este es una inmunoglobulina IgG seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2 e IgG4.

33. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 27, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este comprende una o más mutaciones en la región Fc.

34. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 33, donde la región Fc comprende una sustitución de aminoácidos S228P.

35. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 34, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este se une al dominio de serina proteasa de MASP-2 humana con una afinidad inferior a 20 nM.

36. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 35, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este se une al dominio de serina proteasa de la MASP-2 humana con una afinidad inferior a 10 nM.

37. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 34, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este inhibe la vía de la lectina en la sangre de los mamíferos.

38. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 37, donde la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución de la deposición de C3b en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina.

39. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 37, donde la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución de la deposición de C4 en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina.
40. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de este del apartado 37, donde la inhibición de la vía de la lectina comprende una disminución de la deposición de MAC en condiciones de ensayo específicas de la vía de la lectina.
41. El anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 34, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este no inhibe la vía clásica en la sangre de los mamíferos.
42. Una composición que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 34 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
43. La composición del apartado 42, donde dicha composición está formulada para la administración subcutánea.
44. Un polinucleótido aislado que codifica las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 34.
45. Una combinación de un polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 34 y un polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 34.

46. Un vector de clonación o vector de expresión que comprende el polinucleótido del apartado 44 o la combinación de polinucleótidos del apartado 45.

47. Una combinación de un vector de clonación o vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este de cualquiera de los apartados 1 a 34 y un vector de clonación o vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de este de uno cualquiera de los apartados 1 a 34.

48. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o vectores de expresión del apartado 46 o del apartado 47.

49. Un proceso para producir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los apartados 1 a 34 que comprende cultivar la célula hospedadora de la Reivindicación 48 y aislar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de este.

50. Un método para inhibir la activación del complemento de la vía de la lectina en un mamífero, el método comprende la administración a un sujeto mamífero que lo necesita de una cantidad de una composición según el apartado 42 que comprende un anticuerpo inhibidor de MASP-2 de alta afinidad o un fragmento de unión a antígeno de este suficiente para inhibir la activación del complemento de la vía de la lectina en el mamífero.

51. El método del apartado 50, donde el sujeto que lo necesita padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad o trastorno de la vía de la lectina seleccionado del grupo que consiste en: una microangiopatía trombótica (TMA),

una afección renal, una reacción inflamatoria resultante de un trasplante de tejido u órgano, una lesión por isquemia-reperfusión, una complicación asociada a la diabetes, una enfermedad o trastorno cardiovascular, un trastorno gastrointestinal inflamatorio, un trastorno pulmonar, una enfermedad o trastorno oftálmico, coagulación intravascular diseminada, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad venooclusiva y hemorragia alveolar difusa.