

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento Biología Molecular

**Inhibición del loop de amplificación de la
vía alternativa con anticuerpos
monoclonales frente a C3 y FB.
Potenciales aplicaciones en la terapia de
patologías del complemento.**

Tesis Doctoral

Marta Subías Hidalgo

Madrid 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



**Inhibición del loop de amplificación de la vía
alternativa con anticuerpos monoclonales
frente a C3 y FB. Potenciales aplicaciones en la
terapia de patologías del complemento.**

Memoria presentada por

MARTA SUBÍAS HIDALGO

para optar al grado de doctor

Dirigida por

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Profesor de Investigación

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

Madrid, 2017

Abstract

The complement system plays a crucial role in a long list of rare and common diseases. The activity of the complement system depends, regardless of the trigger, on the alternative pathway (AP). Therefore, inhibition of the AP C3-convertase is predicted to be a very efficient target to inhibit complement for the treatment of complement dysregulation disorders.

We describe the generation and characterization of mouse monoclonal antibodies (mAbs) against FB and C3, the two components of the AP C3-convertase; one mAb targeting FB and three targeting C3. These mAbs effectively block formation of the AP C3-convertase or the interaction of the AP C3-convertase with the C3 substrate, inhibiting completely complement activation. Different *in vitro* and *in vivo* models of complement related diseases such as atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) or myasthenia gravis (MG) help us to demonstrate the usefulness of these mAbs as therapeutic tools. We also describe a mAb that specifically binds to a neoepitope in the proteolytic C3 fragments iC3b/C3dg. These mAbs are very rare and offer interesting diagnostic opportunities.

Eculizumab is currently the only drug approved to inhibit complement in the clinic. Nowadays, PNH and aHUS patients are successfully treated with this humanized mAb, however, eculizumab treatment have been reported to be heterogeneous among PNH patients. We have studied a cohort of PNH patients under eculizumab treatment for signs of hemolysis, and assessed complement biomarkers trying to explain the differences in response to eculizumab. We shown that despite complete C5 blockage, most of the patients studied presented low level hemolysis, probably as a consequence of the extracellular removal of the C3 opsonized PNH-erythrocytes (PNH-E) generated during the eculizumab treatment. We also show that levels of the complement regulator complement receptor 1 correlated with C3 deposition in PNH-E, and that continuous AP activation in these patients could result in an acquired partial C3 deficiency that may increase their susceptibility to infections. As a result of this study, we have developed a procedure for the evaluation of eculizumab levels and complement inhibition in the treated patients, which is currently being used to personalize the eculizumab administration.

Índice

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	
1. El Sistema del Complemento	7
1.1 Activación del complemento	8
1.2 La vía lítica	9
1.3 La C3-convertasa de la vía alternativa	11
1.3.1 C3	11
1.3.2 FB	11
1.3.3 Formación de la AP C3-convertasa	12
1.3.4 Unión de la AP-C3 convertasa a C3	14
2. Regulación del sistema de complemento	15
2.1 Reguladores	15
2.2 Proteólisis de C3b	16
3. Desregulación del complemento y enfermedad	17
3.1 Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)	18
3.2 Síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa)	19
4. Terapia en complemento	20
4.1 Clasificación de las terapias anti-complemento	20
4.2 Consideraciones para el desarrollo y selección de un tratamiento	23
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Purificación de proteínas del complemento	33
1.1 Purificación de C3 humano	33
1.2 Purificación de Factor B humano	34
1.3 Purificación de Factor I humano	34

1.4 Purificación de fragmentos activos de C3	34
2. Generación de anticuerpos monoclonales	35
3. Generación de Fabs	36
4. Ensayos de ELISA	36
4.1 Reactividad de anticuerpos monoclonales	36
4.2 Niveles de eculizumab libre en sueros	37
4.3 Niveles de C5b9 soluble en plasma	37
5. Electroforesis en geles de acrilamida y Western Blot	38
6. Ensayos de activación de C3 e inactivación de sus fragmentos derivados	39
6.1 Ensayo de activación de C3	39
6.2 Ensayo de activación de C3 en presencia de factores nefríticos de C3	35
6.3 Ensayo de inactivación de C3b	40
7. Estudios por resonancia de plasmón en superficie	40
7.1 Caracterización afinidad antígeno-anticuerpo	40
7.2 Formación de la AP C3-proconvertasa en presencia de FB28.4.2	41
8. Ensayos hemolíticos	41
8.1 CH50	41
8.2 AP50	42
8.3 Ham test	42
8.4 Ensayos hemolíticos con sueros de otras especies	43
9. Citometría de flujo	43
9.1 Depósito de C3 y CD59 sobre los eritrocitos	43
9.2 Inhibición del depósito de C3 en eritrocitos de conejo	44
10. Genotipado	44

RESULTADOS

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento con potenciales aplicaciones en terapia y diagnóstico	47
1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a Factor B	47
1.1 Purificación de antígenos: FB, Bb y Ba	47
1.2 Generación de anticuerpos monoclonales frente a FB	48
1.3 Caracterización bioquímica y funcional del FB28.4.2	48
1.3.1 El FB28.4.2 bloquea la activación de la AP	48
1.3.2 El FB28.4.2 reconoce el dominio Ba de FB con alta afinidad	50
1.3.3 El FB28.4.2 inhibe la formación de la AP C3-proconvertasa	51
1.4 El FB28.4.2 inhibe la activación del complemento en diferentes modelos de enfermedad asociados a desregulación del complemento	53
1.4.1 El FB28.4.2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos de carnero en un modelo in vitro de SHUa	53
1.4.2 El FB28.4.2 bloquea el depósito de fragmentos de C3 y sC5b9 en un modelo ex vivo de SHUa	55
1.4.3 El FB28.4.2 inhibe la lisis y opsonización de eritrocitos HPN	56
1.4.4 El FB28.4.2 previene la aparición de la enfermedad en un modelo in vivo de EAMG	58
2. Generación y caracterización de anticuerpos frente a C3	61
2.1 Purificación de antígenos: C3, C3b, iC3b y C3dg	61
2.2 Generación y selección de mAbs anti-C3	61
2.3 Caracterización mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4	61
2.3.1 Caracterización bioquímica	61
2.3.2 Caracterización funcional	63
2.3.3 Caracterización estructural	66
2.4 Aplicación de los anticuerpos en modelos de enfermedad asociados a desregulación del complemento	69

2.4.1 Modelo in vitro de SHUa	69
2.4.2 Modelos in vitro de HPN	70
2.4.3 Modelo in vitro de Glomerulopatía C3 asociada a C3NeFs	71
2.5 Caracterización mAb C3-12.2	73
3. Búsqueda de evidencias que expliquen las diferencias en la respuesta al tratamiento con eculizumab entre pacientes HPN	77
3.1 Respuesta al tratamiento con eculizumab en la cohorte HPN	77
3.2 Los pacientes HPN con mayor porcentaje de eritrocitos opsonizados con C3 presentan signos de hemólisis extravascular	80
3.3 Correlación entre niveles más bajos de CR1 con un mayor porcentaje de eritrocitos HPN C3 ⁺	82
3.4 Los pacientes <i>CR1-H/CR1-L</i> presentan consumo de C3	83
3.5 Polimorfismos en otros genes del complemento	84
3.6 Niveles de eculizumab libre y actividad CH50: La activación del C5 está bloqueada	84
DISCUSIÓN	89
1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a FB	90
2. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a C3	92
3. Evaluación de la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN	99
CONCLUSIONES	
1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento con potenciales aplicaciones en terapia y diagnóstico	105
2. Evaluación de la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN	106
BIBLIOGRAFÍA	109

Abreviaturas

AP	Vía alternativa
BSA	Bovine serum albumin
CP	Vía clásica
CR1	Complement receptor 1
C3G	Glomerulopatía C3
C3NeFs	Factores nefríticos de C3
CVF	Cobra venom factor
DAF	Decay accelerating factor
DDD	Enfermedad por depósito denso
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme linked immunoadsorbent assay
FB	Factor B
FD	Factor D
FH	Factor H
FI	Factor I
HPN	Hemoglobinuria paroxística nocturna
Kb	Kilobases
LP	Vía de las lectinas
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAC	Complejo de ataque a membrana
MASP	Serín proteasas de unión a MBL
MBL	Lectinas de unión a manosa
MCP	Membrane cofactor protein
MG	Macroglobulina
NHS	Suero humano normal
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Polimerase chain reaction

rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SHUa	Síndrome hemolítico urémico atípico
SP	Serín proteasa
T. amb	Temperatura ambiente

Introducción

1. El sistema de complemento

El sistema de complemento es un componente esencial de la inmunidad innata, constituyendo una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos. Varios estudios evolutivos demuestran la existencia de un sistema de complemento primordial en cnidarios, remontando así su origen a hace más de 500 millones de años (Nonaka, 2014).

Su descubrimiento no llegó hasta la segunda mitad del siglo XIX. Nutall, Buchner y Pfeiffer describieron que el suero de animales infectados tenía capacidad lítica, propiedad que denominaron como alexina. Unos años más tarde, Bordet identificó a la alexina como la parte termolábil del suero, mientras que la parte termoestable eran los anticuerpos. Pero fue Ehrlich, quien propuso que en vez de alexina se acuñara el término de complemento, ya que esta parte termolábil era necesaria para “complementar” la función antibacteriana de los anticuerpos, de ahí el nombre de sistema de complemento. Más adelante se conocería que este término era erróneo, ya que el sistema de complemento podía actuar independientemente de la presencia de anticuerpos. Sin embargo, no ha sido hasta hace poco más de una década, cuando se ha revelado que sus funciones van mucho más allá de la eliminación de patógenos, participando multitud de procesos críticos para la homeostasis y supervivencia celular.

El sistema de complemento puede mediar de forma directa la lisis del patógeno, pero en muchos casos, son las señales proinflamatorias y la fagocitosis las que conforman la respuesta de defensa. Durante el proceso de activación del complemento se generan anafilotoxinas (C3a y C5a) que actúan como quimioatrayentes y que van a guiar a neutrófilos, monocitos y macrófagos hacia el sitio de activación mediando así una **respuesta proinflamatoria** (Klos, et al., 2009). Estas células del sistema inmune cuentan además en su membrana con receptores de proteínas del complemento. Cuando el complemento se activa sobre la superficie del patógeno, lo va a marcar u **opsonizar** para que éste pueda ser detectado por los receptores de complemento de macrófagos y neutrófilos que lo van a fagocitar (van Lookeren Campagne, et al., 2007). Este sistema de opsonización y fagocitosis por macrófagos también se emplea para la **eliminación de células apoptóticas y complejos inmunes** (Trouw, et al., 2008). Tanto las células B como las células T tienen en sus membranas receptores de complemento, lo que sugiere que el complemento también contribuye a la **modulación la respuesta inmune adaptativa**. El sistema del complemento participa en la **homeostasis, migración y diferenciación de linfocitos T/B y células dendríticas** (Kolev, et al., 2014). Además, el sistema de complemento **interactúa con otros sistemas como el de**

coagulación y los receptores Toll-like, coordinando así las respuestas inmunitaria e inflamatoria (Amara, et al., 2008, Hajishengallis and Lambris, 2010). Por último, el complemento también participa en otros procesos como la maduración de las conexiones sinápticas, angiogénesis, regeneración tisular, movilización de células hematopoyéticas y metabolismo de lípidos (Ricklin, et al., 2010).

1.1. Activación del complemento

EL sistema de complemento está compuesto por más de 50 proteínas solubles o de membrana. La mayoría de estas proteínas se sintetizan en el hígado, aunque también es importante la biosíntesis local de algunos tipos celulares como linfocitos B y T, fibroblastos, adipocitos, células epiteliales... sobre todo en órganos como el ojo y el cerebro (Morgan and Gasque, 1997). Los componentes del sistema de complemento están presentes de forma ubicua en el organismo (muchas de estas proteínas circulan como zimógenos) pero su activación se produce a nivel local. El complemento puede activarse por tres vías diferentes dependiendo de cuál sea la molécula que desencadene esta activación (Walport, 2001, Walport, 2001) (Figura 11).

La vía clásica (CP) se activa por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo, principalmente inmunoglobulina M (IgM) y algunos tipos de IgG, aunque también puede activarse directamente por otras moléculas presentes en algunas bacterias y virus, por DNA, proteína C reactiva... (Nayak, et al., 2012). Estas moléculas van a ser reconocidas por el complejo enzimático C1, el cual se activará y proteolizará a las proteínas C2 y C4 formando la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2b) sobre la superficie activadora.

En el caso de la vía de las lectinas (LP), las moléculas activadoras son carbohidratos de glicolípidos y glicoproteínas presentes en la superficie de algunos microorganismos que son reconocidos por las lectinas de unión a manosa (MBL) o algunas ficolinas. Ambas circulan asociadas a serín proteasas de unión a MBL (MASP). Este complejo funciona igual que el complejo C1, proteolizando C4 y C2 que formarán la misma C3 convertasa que la de la vía clásica (Garred, et al., 2016).

Independientemente del origen, la CP/LP C3-convertasa cortará el C3 del plasma liberando C3a (anafilotoxina) y C3b, la principal opsonina del complemento. El C3b, a diferencia de C3, expone un grupo reactivo que le permite anclarse a las superficies. El C3b puede unirse a la proteasa factor B (FB) formando la AP C3-proconvertasa (C3bB) que será rápidamente transformada por el factor D (FD) en la C3 convertasa (C3bBb) de la vía

alternativa (AP), que puede a su vez activar más C3 a C3b generándose un loop de amplificación. La eficiencia de la respuesta de complemento depende hasta en un 80% en la activación de la vía alternativa, incluso cuando se ha iniciado por la CP/LP (Harboe, et al., 2004, Harboe, et al., 2009).

La activación de la vía alternativa no depende del reconocimiento de ninguna molécula, sino que se activa mediante un mecanismo espontáneo conocido como tick-over. Mediante este mecanismo, el C3 puede hidrolizarse a C3(H₂O) sufriendo unos cambios estructurales que le asemejan a C3b, pudiendo ahora interactuar con FB y FD para formar la AP C3-convertasa (Pangburn, et al., 1981).

1.2. Vía lítica

El continuo depósito de C3b sobre la superficie favorece que la C3-convertasa cambie su especificidad por el sustrato, pasando a ser ahora una enzima que corta C5, la C5 convertasa. El mecanismo molecular por el cual esto ocurre se desconoce de momento, pero estudios recientes parecen apuntar que es la alta densidad de moléculas de C3b, probablemente contactando unas con otras, depositadas sobre una superficie las que provoquen este cambio de especificidad (Berends, et al., 2015). La C5-convertasa activa C5 liberando la anafilotoxina C5a y generando C5b, molécula que iniciará la formación del complejo de ataque a membrana (MAC). El C5b, asociado todavía a la C5-convertasa, puede unir los componentes C6 y C7 (C5b-7). Este complejo tri-molecular sufre una serie de cambios conformacionales que lo separan de la convertasa pero que a su vez le hacen exponer un sitio hidrofóbico que le permite unirse a la membrana. Sin embargo, la formación del MAC es un proceso muy ineficaz, por un lado este sitio hidrofóbico es muy lábil y además puede ser fácilmente bloqueado por la unión de diversas proteínas plasmáticas como la vitronectina y la clusterina. Si el siguiente componente, C8, se une al complejo C5b-7 antes de que éste se haya anclado a la superficie, también lo incapacita para que pueda unirse a la membrana. Este complejo en fase fluida continuará uniendo C9 conformando el complejo de ataque a membrana en fase fluida (sC5b-9). Si por el caso contrario, el C8 se une al complejo C5b-7 una vez ya está unido a la superficie, se reclutarán secuencialmente muchas copias de la proteína C9 que se insertarán dentro de la bicapa lipídica hasta formar el poro lítico del MAC (Morgan, 2016).

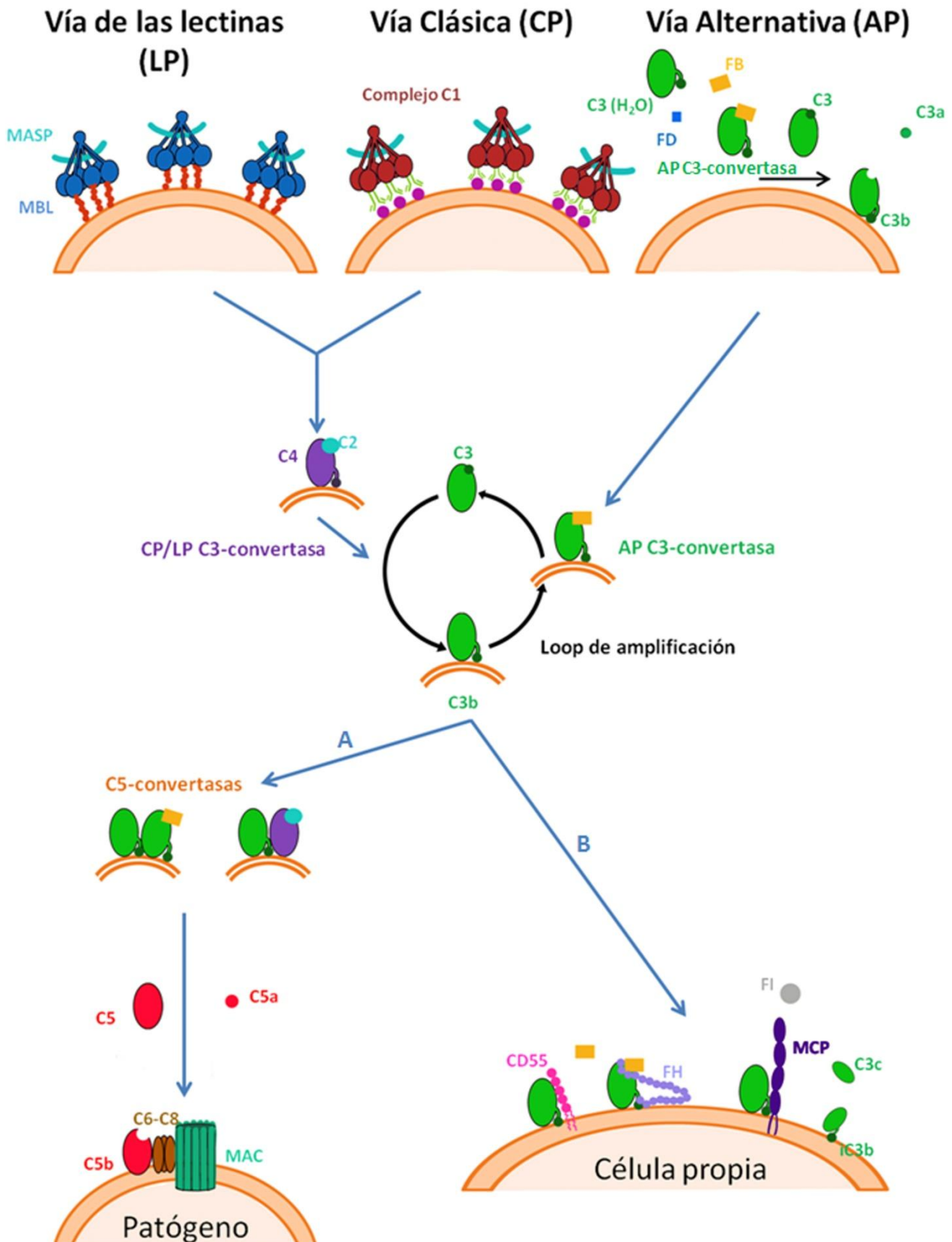


Figura I1. Cascada de activación del complemento. Moléculas presentes en la superficie de los microorganismos (glicógenos (LP) o anticuerpos (CP)) o el mecanismo de tick-over (AP) pueden activar la respuesta del complemento. La formación de las C3-convertasas de cada una de las vías permite la activación de C3 a C3b que se depositará sobre las superficies y a su vez formará más AP-C3-convertasa amplificando la respuesta del complemento (loop de amplificación). A) El depósito masivo de C3b en el patógeno conduce a la formación de las C5-

convertasa que activarán el C5 iniciando el proceso de formación del poro de ataque a membrana (MAC) que lisará el patógeno. B) Nuestras células cuentan con numerosos reguladores (MCP, FH, CD55) que impiden el acúmulo de C3b o bien disociando las C3-convertasas o degradando el C3b.

1.3. La C3-convertasa de la vía alternativa

La C3-convertasa de la AP es el elemento central dentro de la cascada de activación de complemento, ya que del loop de amplificación producido por esta AP C3-convertasa depende que progrese o no la respuesta al estímulo. Sus dos componentes son el C3 y el FB (Lachmann, 2009).

1.3.1 C3

C3 es una de las proteínas plasmáticas más abundantes, con una concentración aproximada de 1 mg/mL. C3 es una glicoproteína globular de unos 185 kDa compuesta por dos cadenas, α de 110 kDa y β de 75 kDa unidas por un puente disulfuro. Cada una de estas cadenas contiene 6 dominios diferenciados existiendo uno adicional que es compartido por ambas cadenas. La cadena β la conforman 5 dominios macroglobulina (MG1-5), una mitad del MG6 (MG6 β) y una región linker (LNK). Los dominios MG1-6 se disponen formando un anillo de una vuelta y media y la región linker atraviesa este anillo por el interior. La cadena α comienza con el dominio anafilotoxina (ANA), fragmento que será liberado como C3a, y se conecta con la otra mitad del MG6 (MG6 α) por el loop α 'NT. Cubriendo el anillo se encuentran el séptimo dominio MG (MG7) seguido de un dominio CUB (complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1) que ancla al resto de la estructura el dominio que contiene el enlace tioéster (TED) seguido del último dominio MG (MG8). En la región C-terminal de la cadena α se localiza el dominio C345C (CTC). El enlace tioéster, que es la región que permite la unión covalente de la molécula a la superficie, en el C3 nativo está oculto en la región de interacción entre el TED y el MG8, lo cual le permite protegerse de la hidrólisis (Janssen, et al., 2005) (Figura I2).

1.3.2 Factor B

El FB es una serín proteasa que circula en plasma como proenzima a una concentración de unos 180 μ g/mL. Con un peso molecular de 90kDa está compuesta por 5 dominios que forman una única cadena. En la molécula se distinguen dos fragmentos, el **fragmento Ba** (33 kDa), en la región N-terminal, formado por 3 dominios SCR (short consensus repeats) y en la zona C-terminal, el **fragmento Bb** (66 kDa), formado por un dominio Von Willebrand tipo A (vWA) y un dominio serín proteasa (SP) (Figura I3). Éste último dominio es el que tiene la

actividad catalítica de la AP C3-convertasa, y por tanto el que cortará la molécula de C3 liberando el fragmento C3a. El fragmento Ba y Bb se unen mediante una región linker que contiene el sitio de corte para Factor D (FD), enzima encargada de escindir el Ba para poder formar la AP C3-convertasa.

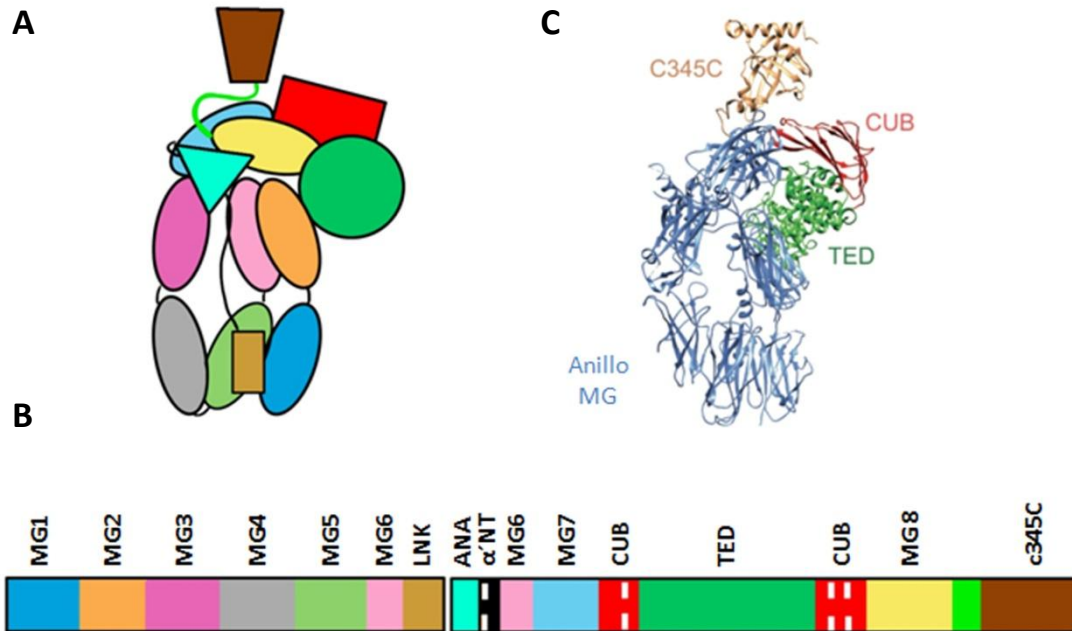


Figura I2. Estructura C3. A) Esquema de la organización de los dominios en C3. Los colores se corresponden con la secuencia de dominios representada en B. C) Estructura cristalográfica de C3 (PDB ID 2A73)(Alcorlo, et al., 2015).

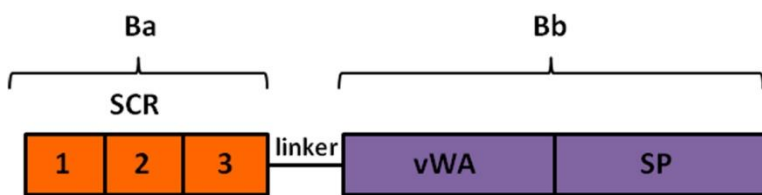


Figura I3. Esquema representativo de los dominios de FB.

1.3.3 Formación de la AP C3-convertasa

La formación de la AP C3-convertasa (C3bBb) se produce en dos pasos. Primero se produce la unión Mg^{2+} dependiente entre C3b y FB, formando una AP C3-proconvertasa (C3bB). Esta unión genera unos cambios conformacionales en FB de tal manera que éste expone el sitio de corte (región linker) para que en un segundo paso, se una la enzima FD que

proteoliza FB liberando el fragmento Ba y formando la AP C3-convertasa (Torreira, et al., 2009).

El FB nunca interaccionaría con el C3 nativo ya que sólo los cambios conformacionales que se producen tras activación de C3 a C3b exponen tanto los sitios de unión a FB como el enlace tioéster. Las estructuras cristalográficas en alta resolución nos han permitido conocer cuáles son estas reorientaciones que experimenta la molécula de C3 al pasar a C3b (Janssen, et al., 2005). Los cambios se producen fundamentalmente en la cadena α , mientras que el anillo de MG de la cadena β permanece estable. El dominio ANA (C3a) protege indirectamente el enlace tioéster al estabilizar la interacción entre el TED y el MG8. Cuando el C3a se escinde de C3 por la AP C3-convertasa, los dominios MG7 y MG8 rotan, el nuevo α 'NT se reorienta, y el CUB y el TED se desplazan hacia fuera del anillo de MG, de tal manera que el enlace tioéster, ahora transformado en grupo acil, queda accesible para interaccionar con cualquier nuclófilo cercano (Figura I4.A). Este grupo reactivo tiene una vida media de menos de un segundo antes de que se hidrolice mecanismo que permite que el C3b se una únicamente a las superficies activadoras.

En el primer paso de la formación de la AP C3-convertasa, la unión de FB a C3b ocurre por medio del fragmento Ba, que interacciona con los dominios α NT, CUB y MG7 de C3b y por el dominio vWa de FB, que se une a la región C345C de C3b. A esta conformación de FB se la conoce como "cerrada", ya que el dominio SP de FB tiene que reorientarse para adoptar una conformación abierta en la que se exponga el sitio de corte para FD (región linker). Sólo en esta conformación abierta el FD puede unirse al complejo. Esta unión desplaza un loop de inhibición contenido en FD convirtiéndola en una enzima activa capaz de proteolizar Ba y formar la AP C3-convertasa. En la AP C3-convertasa el dominio SP de FB se desplaza hacia fuera del complejo y la unión entre C3b y FB se mantiene por medio del dominio vWa con la región C343C de C3b (Forneris, et al., 2010, Janssen, et al., 2009, Rooijackers, et al., 2009, Torreira, et al., 2009) (Figura I4.B). Esta convertasa es estable durante unos 90 s, tras los cuales, el fragmento Bb se disocia de C3b y éste ya no puede volver a unirse a otra molécula de C3b, estableciendo así un fuerte sistema de control. Para la amplificación de la respuesta de complemento progresa se requiere de una continua generación de nuevas C3bBb convertasas.

Tanto el C3 como el FB necesitan estar disponibles de forma instantánea para que así el complemento pueda responder rápidamente ante cualquier amenaza. El hecho de que en su forma nativa no haya interacción entre ambas moléculas, ya que ambas requieren de cambios conformacionales, permite que en el plasma puedan encontrarse a altas concentraciones. Además, a éste se suman otros mecanismos de control que evitan la formación espontánea de

AP C3-convertasas como son, la baja concentración plasmática de FD (0.002 mg/mL), su loop inhibitorio, y el hecho de que sólo pueda unirse a la conformación abierta de FB.

Una vez formada la AP C3-convertasa, ésta se estabiliza gracias al regulador positivo properdina (P), que se une a C3b y FB prolongando su actividad entre 5-10 veces más (Fearon and Austen, 1975).

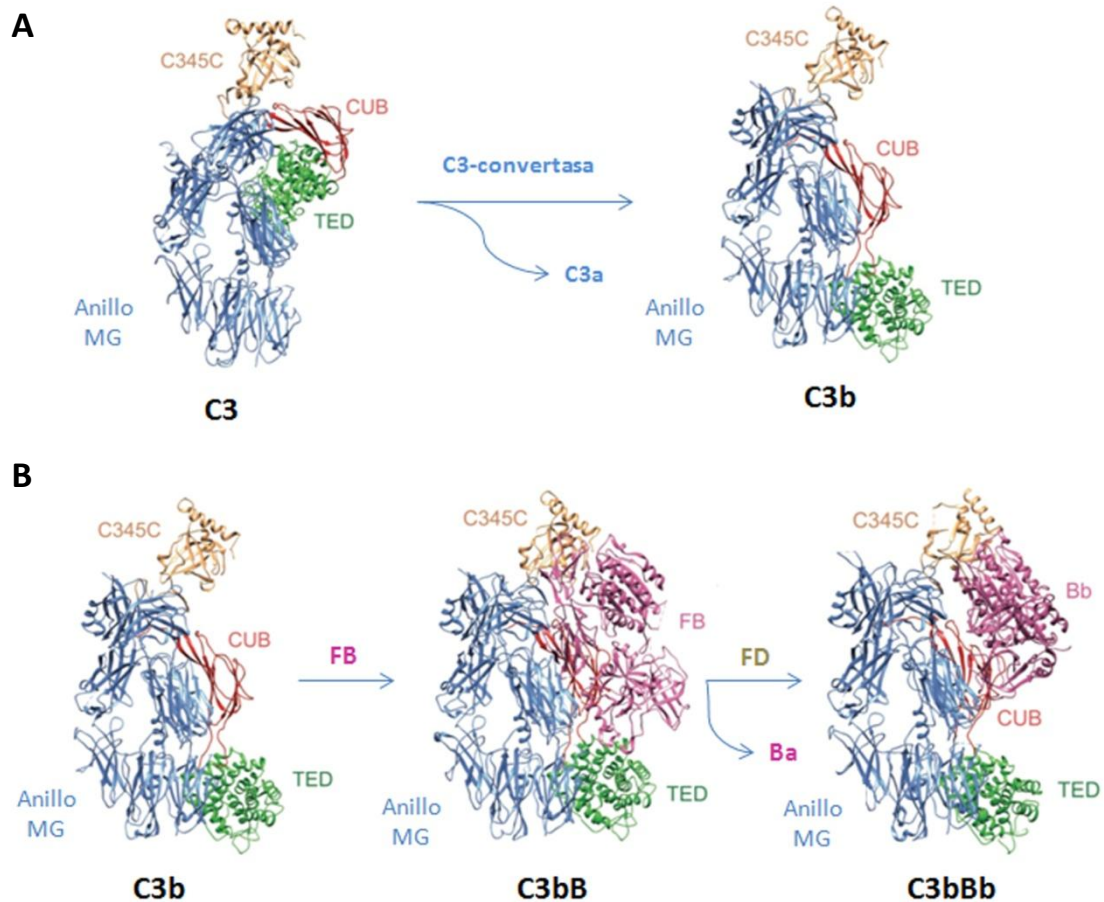


Figura I4. Estructura de C3, C3b y la C3-convertasa. A) Cambios conformacionales que sufre C3 (PDB ID 2A73) al activarse a C3b (PDB ID 2I07). B) Formación de la C3-convertasa; a la molécula de C3b se le une Fb para formar la C3-proconvertasa (C3bB) (PDB ID 2XWJ). El FD escinde la región Ba del Fb formándose la C3-convertasa (C3bBb) (PDB ID 2WIN). Figura adaptada de Alcorlo et al.,2015 (Alcorlo, et al., 2015).

1.3.4 Unión de la AP C3-convertasa a C3

Pese a no contar con la estructura de la AP-C3 convertasa unida a su sustrato, los datos aportados por las estructuras de C5-CVF (Laursen, et al., 2011) y SCIN-C3bBb(Rooijackers, et al., 2009) sugieren que la interacción entre la AP-convertasa y su sustrato ocurriría a través de los dominios MG4-MG5 y MG7-MG8 de ambas proteínas. En este modelo, la región SP de FB y el dominio ANA quedarían alejados, por lo que se especula que sería el movimiento del

dominio flexible C345C el que aproximaría el centro catalítico de Bb a al sitio de corte en C3 para que se produjese la activación de C3.

2. Regulación del sistema de complemento

2.1. Reguladores

Al activarse C3, el C3b/C3(H₂O) puede depositarse sobre la superficie más cercana, no diferenciando entre propias o patógenas. Por ello, en el organismo contamos con numerosos reguladores tanto solubles como de membrana que nos permiten regular la activación de complemento a diferentes niveles (Schmidt, et al., 2016):

- Disociando la convertasa (Actividad de decay), al competir por los sitios de unión entre C3 y FB.
- Degradando C3b.

Entre estos reguladores destacan:

- En fase fluida:

Factor I (FI), serín proteasa, que requiriendo siempre de la presencia de un cofactor media la proteólisis de los fragmentos de C3.

Factor H (FH), el regulador por excelencia de complemento. Tiene actividad de decay sobre la AP C3-convertasa y también actúa como cofactor para FI. Pese a ser una proteína plasmática, también es capaz de reconocer el C3b unido a las superficies.

C4 binding protein (C4BP), capaz de disociar la CP/LP C3-convertasa.

C1 inhibidor (C1-INH), que inactiva C1r, C1s, MASP-1 y MASP-2, regulando la CP y LP.

Vitronectina y clusterina, que se unen a los complejos C5b-7/8/9 e impiden la generación del MAC.

MAP-1, se une a MBL y ficolinas inhibiendo la activación de la LP.

- En superficie:

Membrane cofactor protein (MCP) o CD46 que posee actividad coactiva.

Complement receptor 1 (CR1) o CD35 que tiene actividad de decay sobre las tres C3-convertasas y también actúa como cofactor.

Decay-accelerating factor (DAF) o CD55, que comparte con CR1 la misma actividad de decay.

Membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL) o CD59 que a diferencia del resto de reguladores bloquea al nivel de formación del MAC.

Además de estos reguladores existen las conocidas como proteínas relacionadas con FH (CFHRs). Éstas se originaron a partir de FH, pero a diferencia de FH, no contienen en su estructura la región reguladora de complemento pero sí han conservado los dominios de reconocimiento de superficies. En la actualidad se considera que su función principal es competir con FH para permitir una mejor discriminación de las superficies en las que la activación del complemento se llevará a cabo (Jozsi, et al., 2015).

2.2. Proteólisis de C3b

Los reguladores de complemento, además de restringir la amplificación de la respuesta de complemento en las superficies activadoras, también procesan la molécula de C3b generando nuevas opsoninas capaces de interactuar con distintos receptores celulares, modulando la respuesta inmune. Se han descrito 5 receptores de complemento presentes principalmente en la superficie de las células del sistema inmune, complement receptor 1 (CR1), CR2, CR3, CR4 y CR1g.

En el procesamiento de C3b por FI, empleando como cofactores a FH, MCP o CR1, se producen dos cortes adyacentes en el dominio CUB que producen la liberación del fragmento C3f generándose la molécula iC3b. Esta molécula puede continuar degradándose mediante otro nuevo corte por FI en la región CUB que desprenderá de la molécula el anillo de MG (C3c). El nuevo fragmento originado, C3dg, se corresponde con el dominio TED que permanecerá unido a la superficie. Esta proteólisis sólo puede ser mediada empleando a CR1 como cofactor (Ross, et al., 1982). C3dg puede todavía ser degradado por distintas proteasas a C3d, que seguirá anclado a la superficie, y C3g que se liberará (Figura I5).

Cada uno de estos fragmentos continuará actuando como opsoninas reclutando diferentes receptores al sitio de activación mediando respuestas que irán desde facilitar la fagocitosis y la eliminación de inmunocomplejos hasta estimular los linfocitos T y B para su maduración, cambio de isotipo y memoria (Erdei, et al., 2016).

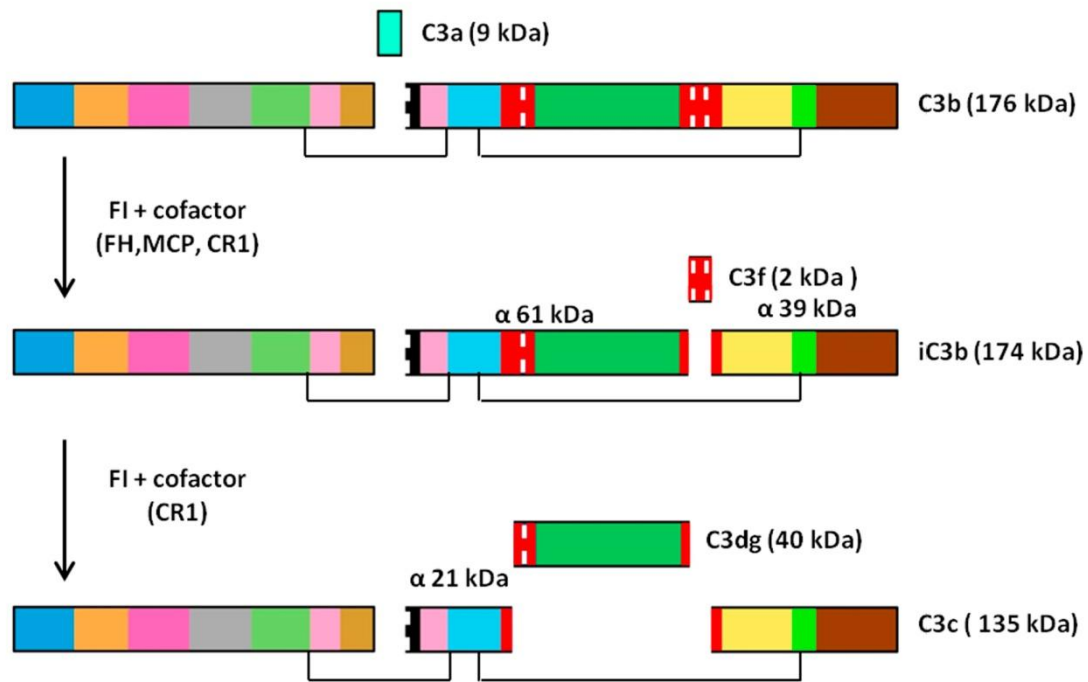


Figura I5. Corte proteolítico de C3. Esquema de la generación secuencial de los fragmentos de C3. El peso molecular de cada fragmento se indica entre paréntesis. El esquema de color de los dominios es el mismo que el que aparece en la figura I2.

3. Desregulación del complemento y enfermedad

En ocasiones, el delicado equilibrio que existe entre la activación y regulación del complemento se rompe, derivando en muchos casos en patología. La lista de enfermedades en las que está involucrado el sistema de complemento no para de aumentar (Holers, 2008, Mathern and Heeger, 2015). En algunas de ellas, el complemento contribuye a incrementar la inflamación y perpetuar el daño tisular, como ocurre en muchas enfermedades inflamatorias, autoinmunes o degenerativas como la artritis reumatoide, miastenia gravis o lupus. En otras, sin embargo, son las mutaciones y/o polimorfismos en los genes de proteínas de complemento los causantes directos de la patología como en el síndrome hemolítico atípico (SHUa), la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), las glomerulopatías C3 (C3G) o la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)(de Cordoba, 2016, Rodriguez de Cordoba, et al., 2011).

Durante el desarrollo de mi tesis doctoral, he empleado varios modelos de algunas de estas patologías, fundamentalmente de HPN y SHUa.

3.1. Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)

La HPN es una enfermedad rara caracterizada por la proliferación clonal de células madre hematopoyéticas portadoras de una mutación somática en el gen *PIGA*, localizado en el cromosoma X (Miyata, et al., 1993, Takeda, et al., 1993). Este gen codifica para una proteína implicada en los primeros pasos de la biosíntesis del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). Como consecuencia, estas células carecen en sus membranas de las más de 150 proteínas que requieren de este anclaje. Pero de entre todas ellas, es la ausencia de los reguladores de complemento CD55 y CD59 lo que provoca las manifestaciones clínicas en estos pacientes. Los principales síntomas de la enfermedad son la anemia hemolítica crónica, insuficiencia de la médula ósea y la trombosis, que es la principal causa de muerte en estos pacientes (Risitano, 2012).

Cuando el C3b generado a través del mecanismo de tick-over se deposita en la superficie de un eritrocito HPN, la respuesta de la vía alternativa de complemento se amplifica, ya que su membrana no cuenta con el regulador CD55. La deposición masiva de C3b y posteriormente de C5 desemboca en la formación del MAC, que en ausencia del regulador CD59, provocará la lisis de los eritrocitos (Figura I6). Como el tick-over se produce de forma espontánea, los pacientes HPN sufren hemólisis crónica.

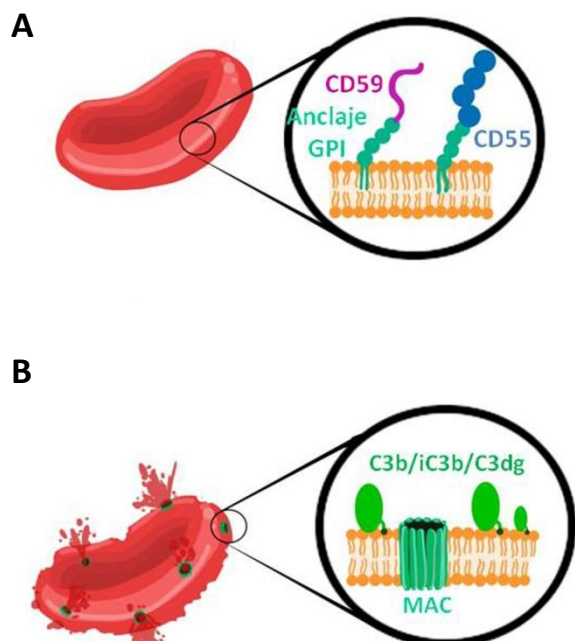


Figura I6. Hemólisis de eritrocitos HPN.

A) Los reguladores de complemento CD55 y CD59 quedan unidos a la membrana de los eritrocitos normales gracias al anclaje GPI. B) Los eritrocitos HPN son susceptibles a la lisis mediada por la activación de complemento debido a la ausencia de los reguladores CD55 y CD59 (como consecuencia de la falta del anclaje GPI).

En la actualidad estos pacientes están siendo tratados con eculizumab (Soliris; Alexion Pharmaceuticals), un anticuerpo anti-C5 que inhibe la activación del C5 por la C5-convertasa y por tanto que progrese la formación del MAC (Rother, et al., 2007). El eculizumab ha transformado la vida de los pacientes HPN, deteniendo la hemólisis, la aparición de trombos y muhcos de ellos ya no necesitan trasfusiones sanguíneas (Hillmen, et al., 2004, Hillmen, et al., 2007, Hillmen, et al., 2006).

Sin embargo, entre un 25-40% de los pacientes tratados con eculizumab continúan presentando anemia baja o moderada y siguen requiriendo de transfusiones sanguíneas (Brodsky, et al., 2008, Hillmen, et al., 2006, Luzzatto, et al., 2011, Risitano, et al., 2009). En los últimos años se han realizado diversos estudios tratando de dilucidar las causas de esta hemólisis que persiste en algunos pacientes. La causa que parece ser más común entre los pacientes y sobre la que se ha recopilado más evidencias es la hemólisis extravascular (Hill, et al., 2010, Risitano, et al., 2009). El eculizumab actúa al mismo nivel que el CD59, impidiendo la formación del MAC, sin embargo, el eculizumab no puede cubrir las funciones del CD55, lo que resulta en una activación masiva de complemento sobre la superficie de los eritrocitos que se recubren de fragmentos de C3 (Logue, et al., 1973). Estos fragmentos de C3 van a actuar como opsoninas para las células del sistema fagocítico mononuclear en el hígado y el bazo, produciéndose la hemólisis extravascular (Jaffe, et al., 1976, Lin, et al., 2015, Ross and Lambris, 1982). Luego en una enfermedad típicamente caracterizada por la hemólisis intravascular, el tratamiento con eculizumab resulta en una hemólisis extravascular crónica. Sin embargo, la razón por la que esto tiene manifestaciones clínicas en algunos pacientes y en otros no es aún desconocida.

3.2. Síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa)

El síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa) es una microangiopatía trombótica que afecta principalmente a la microvasculatura del riñón. Es otra enfermedad rara cuyos principales síntomas son la anemia hemolítica, trombocitopenia y fallo renal agudo. El daño en el endotelio está causado por una desregulación de la activación de complemento sobre las superficies, como así lo demuestran numerosos estudios en los que se muestra una asociación entre mutaciones y polimorfismos en genes de proteínas reguladoras de complemento y aHUS, principalmente en la región C-terminal de FH (región de reconocimiento de superficies)(de Cordoba, 2016, Rodriguez de Cordoba, et al., 2014). También se han localizado mutaciones en C3 y FB que se traducen en la generación de AP C3-convertasas más estables y por tanto más

difíciles de regular. Los auto-anticuerpos frente a la región C-terminal de FH se asocian igualmente con el desarrollo de la patología.

Muchos de los pacientes de SHUa también son tratados con eculizumab. Al igual que ocurría con los pacientes HPN, el eculizumab ha revolucionado el transcurso de la enfermedad de SHUa, y los pacientes ya no requieren de plasmaféresis, no sufren episodios de microangiopatía trombótica y son capaces de recuperar su función renal (Licht, et al., 2015).

4. Terapia en complemento

Los beneficios de la inhibición del sistema de complemento se conocen desde hace más de 40 años, pero no ha sido hasta esta última década cuando las terapias anti-complemento han conseguido llamar la atención de los clínicos y empresas farmacéuticas. En la actualidad, existen únicamente dos fármacos con autorización para uso clínico, el eculizumab, y el regulador fisiológico C1 inhibidor (C1-INH), una serín proteasa que bloquea la formación de las C3-convertasas de la CP y LP que se usa para el tratamiento del angiodema hereditario.

La implicación del sistema de complemento en nuevas funciones biológicas, su asociación con una lista creciente de enfermedades, los estudios de correlación genotipo-fenotipo y el gran éxito del uso del eculizumab, han promovido que se considere el complemento como un importante blanco terapéutico para el tratamiento de muchas enfermedades trombóticas, del sistema inmune y degenerativas así como para su uso en trasplantes. Actualmente ya hay más de 20 fármacos que se están evaluando en diferentes ensayos clínicos (Morgan and Harris, 2015, Ricklin and Lambris, 2016).

4.1. Clasificación de las terapias anti-complemento

Atendiendo a su naturaleza química, en esta lista de fármacos se encuentran anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, RNA de interferencia (siRNA) y fármacos biológicos, aportando cada uno diferentes ventajas e inconvenientes. Por ejemplo, las moléculas pequeñas a diferencia de los anticuerpos, tiene una vida media más corta y en muchos casos no son útiles para interferir en las interacciones proteína-proteína, pero por otro lado, su capacidad para penetrar en los tejidos es mucho mayor, son más baratas de producir y se pueden administrar de forma oral.

La forma en la que se activa y se regula el complemento ofrece numerosos puntos de intervención terapéutica. Como ya se ha comentado, el sistema de complemento lo conforman alrededor de unas 50 proteínas entre reguladores, activadores y receptores que interactúan entre sí y con otros sistemas. Debido a esta compleja red de interacciones, es difícil pensar que una única terapia pueda dar solución a todas las enfermedades derivadas de la desregulación del complemento, y de ahí, que se estén desarrollando diferentes estrategias capaces de bloquear la actividad de complemento en distintos puntos de la cascada de activación. Esta diversidad nos permitiría elegir un fármaco específico para el tratamiento cada enfermedad.

En función de hacia qué región de la ruta de activación del complemento vayan dirigidas, las terapias anti-complemento pueden clasificarse en:

- **Terapias que bloquean el inicio de la activación:**

El complemento puede ser activado por tres vías distintas, de manera que el bloqueo específico de una de ellas no impide que el complemento pueda iniciarse por cualquiera de las otras dos vías. Estas estrategias podrían seguirse cuando se conoce que el desarrollo de la enfermedad depende principalmente de una vía, como es el caso de las anemias hemolíticas autoinmunes, en la que los depósitos de auto anticuerpos sobre los eritrocitos activan la CP causando su lisis, o cuando se conoce que son consecuencia de la deficiencia de algunos de sus componentes, como es el caso del C1 INH en el angiodema hereditario.

Los fármacos pueden dirigirse hacia los componentes específicos de cada vía, como los anticuerpos anti-C1s (TNT009; True North), anti-C1q (ANX005; Annexon) o anti-MASP-2 (OMS-721; Omeros), o hacia las CP/LP C3-convertasas como es el caso del C1-INH (Riedl, et al., 2014) o el anti-C2 (Prothix).

- **Terapias que bloquean el loop de amplificación:**

En las enfermedades en las que la activación inicial del complemento es más compleja y la opsonización juega un papel fundamental para su desencadenamiento, la inhibición de la formación de las AP C3-convertasas puede suponer una solución. Con este tipo de terapias se inhibe indirectamente el resto de las vías, ya que su progreso depende de la amplificación por las AP C3-convertasas. Además, también se bloquean todas las funciones pro-inflamatorias que ejercen los fragmentos derivados del corte de C3.

Para controlar la actividad de la AP C3-convertasas pueden seguirse varias estrategias; Se puede como se ha mencionado anteriormente, bloquear cualquiera de sus componentes

impidiendo así la formación de la AP-C3 convertasa, o se pueden emplear los propios reguladores fisiológicos de la convertasa para provocar su disociación o la degradación de C3b.

Para abordar la primera estrategia se han diseñado anticuerpos frente a FD (lampalizumab, Genetech) (Katschke, et al., 2012), que se encuentra en la fase III para el tratamiento de DMAE, frente a FB (1379, Alexion) (Thurman, et al., 2005), C3b (H17, Elusys) (Paixao-Cavalcante, et al., 2014) y propedina (CLG561, Novartis). En paralelo, también se han desarrollado moléculas pequeñas y péptidos que inhiben estas mismas proteínas. Entre ellos destaca compstatin (Cp40, Amybdas) (Mastellos, et al., 2015), que es un péptido que se une a C3 y previene su activación por las C3-convertasas, que está en fase de pruebas para el tratamiento de DMAE, HPN, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En cuanto a la segunda estrategia, los esfuerzos se han centrado principalmente en FH y CR1. El CR1 soluble (TP20) ha demostrado su eficacia en varios modelos animales y sus posteriores modificaciones que favorecen su acumulación en los tejidos están resultando muy prometedoras (Banz, et al., 2007). De forma similar, también se ha reducido el tamaño de FH creando el mini-FH (AMY-201; Amyndas) (Schmidt, et al., 2013), que contiene únicamente los dominios de unión a C3b y GAGs junto con los dominios de regulación. Otra de las líneas en desarrollo es el TT30 (Alexion), una proteína híbrida CR2-FH que está en ensayos clínicos para el tratamiento de HPN (Risitano, et al., 2012).

- **Terapias que bloquean la vía terminal:**

Por último, están las terapias que regulan la parte efectora del complemento, la vía terminal. Este tipo de terapias están encaminadas al tratamiento de enfermedades que se producen como consecuencia de la lisis celular causada por el MAC, como pueden ser HPN o SHUa, aunque también están incluidas las terapias dirigidas al tratamiento de enfermedades en las que la inflamación mediada por el C5a juega un papel importante.

Dentro de este grupo destaca el eculizumab (Rother, et al., 2007), el anticuerpo que se une a C5 e impide su activación por las C5-convertasas. Desde su aprobación en el 2007 para el tratamiento de HPN y en el 2011 para SHUa, se han desarrollado versiones mejoradas para incrementar su vida media, y se ha incluido en varios ensayos clínicos para una decena más de enfermedades (Morgan and Harris, 2015, Yamaguchi, et al., 2016, Yehoshua, et al., 2014).

Debido a su alto coste, otras empresas farmacéuticas han desarrollado estrategias similares que van desde nuevos mAb anti-C5 (LFG316, Novartis), fármacos biológicos (Coversin, Volution

Immuno Pharmaceuticals) hasta siRNAs (ARC1905, Ophthotech; ALN-CC5, Alnylan), y todos ellos están siendo evaluados en ensayos clínicos.

La inhibición de la señal de C5a se puede conseguir, o bien bloqueando el ligando, C5a o su receptor, C5aR1. Para bloquear el acceso al C5aR1 se han diseñado moléculas pequeñas (CCX-168, ChemoCentryx), que está en fase II para el tratamiento de las vasculitis anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo, mientras que para el ligando, se han diseñado anticuerpos (IFX-1, InflaRx) en fase II para el tratamiento temprano de sepsis y choque séptico y aptámeros (NOX-D19 hasta NOX-D21, Spiegelmer).

4.2. Consideraciones para el desarrollo y selección de un tratamiento

A la hora de iniciar el tratamiento con cualquiera de las terapias anti-complemento se tendrán en consideración los posibles efectos secundarios derivados de su tratamiento. Independientemente de la vía que se inhiba, el paciente será más susceptible a infecciones, y de ahí que el tratamiento suele acompañarse de medidas profilácticas como el tratamiento con antibióticos. Todavía no está aceptado el uso clínico de ningún fármaco que bloquee la activación sistémica de C3, como compstatin, pero será interesante ver cómo estos individuos responden a las infecciones y analizar si tiene algún efecto en su respuesta inmune adaptativa. Basándonos en los pacientes con deficiencias en las proteínas C1q o C4, el bloqueo selectivo de la vía clásica también podría afectar a la capacidad del paciente para eliminar inmuno-complejos y restos apoptóticos (Lintner, et al., 2016).

Otra de las consideraciones a tener en cuenta es la dosis. Dependiendo de la patología a tratar, la duración del tratamiento puede variar, pudiendo haber casos, como en los trasplantes o casos de isquemia-reperfusión, en los que una única dosis sea suficiente, u otros, como HPN o SHUa en los que se requiera de un tratamiento de por vida. La dosis, por tanto, influirá a la hora de elegir la naturaleza química del fármaco así como la molécula diana frente a la que van dirigidos.

Muchas de las proteínas del complemento se encuentran en plasma a altas concentraciones, C3 (1 mg/mL), FB (180 µg/mL) pero además, pese a que otras estén a menor concentración, la tasa de reposición es elevada; por ejemplo, la tasa de reposición del C5 (80 µg/mL) (Sissons, et al., 1977) es de 60h, y la del FD (5 µg/mL) es de 1.33 mg por kg al día (Pascual, et al., 1988). A todo ello, además hay que sumarle, las variaciones que puede haber debido episodios agudos como los procesos infecciosos. Esto exige que se requieran de altas cantidades de fármaco y que para mantener estas concentraciones elevadas las dosis tengan

que ser frecuentes; para el tratamiento del angiodema hereditario con C1-INH se requiere de una dosis intravenosa de entre 100-250 mg cada 3 días (Cocchio and Marzella, 2009) y para el tratamiento de HPN con eculizumab una dosis intravenosa de 900 mg cada 2 semanas (Rother, et al., 2007). Es por todo ello, que los investigadores junto con las empresas farmacéuticas han centrado sus esfuerzos en aumentar la vida media de los fármacos y en facilitar su administración.

Como se ha comentado anteriormente, la naturaleza del fármaco determina en cierto grado su vida media; las moléculas pequeñas tienen una vida media inferior a la de los anticuerpos, pero hay circunstancias, en las que esto puede suponer una ventaja, como es el caso de un trasplante o un infarto. En estos casos se requiere puntualmente una dosis elevada y que sea capaz de penetrar bien en el órgano deseado, pero luego, deseas que sea eliminada del organismo con rapidez.

Otra estrategia que despierta el interés de la industria es la de la localización del fármaco en el lugar donde el complemento se está activando en vez de inhibir de forma sistémica el complemento. Por un lado, la administración local favorece la llegada del fármaco al órgano que se desea tratar, como es el caso del tratamiento con Lampalizumab en pacientes con DMAE directamente en los ojos, y por otro lado, se están desarrollando terapias que llevan acopladas receptores de proteínas de complemento que la dirigirán a los lugares de activación.

Al mismo tiempo que se desarrollan nuevas estrategias terapéuticas, necesitan implementarse buenos modelos animales de enfermedades del complemento así como nuevos biomarcadores. Los modelos animales, además de ayudarnos a comprender los mecanismos moleculares detrás de cada patología, nos van a permitir diseñar ensayos preclínicos para así seleccionar el tratamiento correcto para cada enfermedad, mientras que unos buenos biomarcadores nos van a permitir hacer un seguimiento de la progresión de la enfermedad y de la eficacia del fármaco.

Conscientes de la necesidad de búsqueda de nuevas terapias que puedan ofrecer un tratamiento más específico para cada una de las distintas enfermedades asociadas con desregulación del complemento, en el laboratorio nos planteamos la generación en ratón de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento que potencialmente pudieran tener una aplicación terapéutica.

La AP C3-convertasa juega un papel central en la activación del complemento, ya que es la responsable de la amplificación de la respuesta del complemento, y de hecho, la mayor parte de los reguladores de complemento actúan favoreciendo su disociación. Por ello, pensamos que una buena aproximación terapéutica para modular la respuesta del complemento sería la inhibición de la formación de la AP C3-convertasa.

Para abordar el diseño de esta estrategia de inhibición de la AP C3-convertasa, nos servimos del conocimiento generado en el laboratorio a partir de la caracterización funcional y estructural de mutaciones y polimorfismos en proteínas de complemento asociadas con patología. En concreto, fue especialmente relevante la información aportada por los trabajos de Montes et al. (Montes, et al., 2009) respecto al polimorfismo en la región Ba de FB y de Torreira et al. (Torreira, et al., 2009), respecto a la formación de la AP C3-proconvertasa:

Montes et al. describieron el mecanismo funcional por el que un polimorfismo en la región Ba de FB confería protección para la DMAE. DMAE es una enfermedad multifactorial, y aunque se desconocen sus mecanismos patogénicos, se piensa que la respuesta inflamatoria causada por una desregulación del complemento contribuye significativamente al progreso de la patología. El polimorfismo se localiza en la posición 32 de FB, dando lugar a tres variantes; fB_{32R} , fB_{32Q} y fB_{32W} , siendo la variante fB_{32Q} la que está asociada a protección. Mediante ensayos de afinidad determinaron que el FB_{32Q} mostraba menor afinidad hacia C3b que el FB_{32R} , lo que conducía a una menor generación de la AP C3-convertasa. Los portadores de la variante fB_{32Q} tienen por tanto mayor dificultad para mantener la respuesta de amplificación del complemento y de ahí que esa variante sea protectora en DMAE.

En el trabajo de Torreira et al. revelaron la existencia de las dos conformaciones “abierta y cerrada” de la AP C3-proconvertasa. En la conformación cerrada, que representaría el reconocimiento inicial entre FB y C3b, la interacción entre los 3 SCR de Ba y C3b es esencial para la formación del complejo.

En conjunto, todos estos datos evidenciaban la importancia de la interacción entre el dominio Ba de FB y el C3b, y cómo pequeños cambios afectaban a la formación de la AP C3-convertasa y como consecuencia a la respuesta del complemento.

Otra potencial aplicación que se buscará en la generación de estos anticuerpos monoclonales es su uso como biomarcadores. Los anticuerpos que reconozcan neoepítomos que se generan durante la activación ya sea de C3 o de FB pueden servir como marcadores de activación de complemento.

Objetivos

1. Bloquear la activación de la vía alternativa como terapia para el tratamiento de patologías del complemento:

- Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a Factor B.
- Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a C3.

2. Evaluar la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN:

- - Estudio de marcadores hemolíticos y biomarcadores de activación de complemento.
-
- - Desarrollo de herramientas que permitan personalizar la administración del eculizumab en los pacientes.

Materiales y Métodos

1. Purificación de proteínas del complemento

1.1. Purificación de C3 humano

El C3 humano se purificó a partir de plasma-EDTA (10mM) obtenido de individuos sanos. Antes de comenzar la purificación el plasma se centrifugó a temperatura ambiente (T amb) 30 min a 12000 rpm y al sobrenadante se le añadió el inhibidor de proteasas benzamidina (10mM).

El primer paso de la purificación consistió en una precipitación con sulfato de sodio (Na_2SO_4) al 10% p/v a T. amb. El sulfato de sodio se añadió poco a poco al plasma que se mantenía en continua agitación, y una vez añadido todo se dejó el plasma en agitación durante 1 h. Tras centrifugarlo 1 h a 10000 rpm a T. amb., el sobrenadante se dializó frente a buffer fosfato 50mM, benzamidina 5mM, EDTA 10mM, NaCl 150mM, pH 7 durante 2 días con 4 cambios de buffer a 4°C.

En el segundo paso de la purificación el dializado, previamente centrifugado 30 min a 12000rpm, se aplicó a una columna de S-Lysina para eliminar el plasminógeno. El no retenido junto con el primer lavado de la columna se dializó frente a Tris 20mM pH 8.6.

Pasados dos días de diálisis, la muestra de nuevo centrifugada, se pasó por una columna de intercambio iónico (DEAE). Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron mediante un gradiente lineal de 0 a 350 mM de NaCl. Se hizo un pool con todas aquellas fracciones que mediante ELISA se había detectado que contenían C3 y se dializaron frente a buffer fosfato 20mM, NaCl 40mM pH6.

Tras la diálisis, la muestra se aplicó a una columna de intercambio catiónico Mono S HR 5/5 (GE Healthcare). La proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de 40 volúmenes de columna (VC) hasta alcanzar una concentración de NaCl de 500mM. Las fracciones obtenidas se analizaron en un gel de SDS-PAGE teñidas con azul de coomasie, seleccionándose aquellas que sólo contuvieran C3.

Una vez purificado el C3 humano, se filtro con una columna Superdex 200 (GE Healthcare) para eliminar posibles dímeros y preparar una muestra homogénea en Hepes 10mM, NaCl 150mM pH 7.4.

La concentración de proteína se calculó usando la absorbancia a 280 nm y un coeficiente de extinción de $0.98 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/mL})^{-1}$.

1.2. Purificación de Factor B humano.

El Factor B (FB) humano se purificó a partir de muestras de plasma-EDTA de individuos sanos.

Para su purificación se empleó una columna de afinidad que consistía en una columna de sepharosa que llevaba acoplada un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-FB humano (D2) generado en el laboratorio. La columna se equilibró con tampón fosfato salino (PBS) 1X pH7.4 y después se aplicó el plasma-EDTA (previamente filtrado). La columna se lavó con PBS 1X y borato sódico pH 8 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1M, NaCl 0.5M). El FB se eluyó con 2 VC de glicina 100mM pH2.5 seguido de PBS. Para tamponar el pH de la glicina de las fracciones eluidas se añadió Tris-HCl 2M pH8 (20 μL por cada 500 μL de elución). Mediante SDS-PAGE y tinción con coomassie se seleccionaron aquellas fracciones que contenían el FB y se hizo un pool con todas ellas. La muestra se dializó frente a Tris 20mM pH8.6.

El siguiente paso en la purificación fue una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare). El FB se eluyó mediante un gradiente lineal de 25 VC (0-350mM NaCl). Las fracciones que contenían FB se filtraron con una columna SuperDex 200 en Hepes 10mM, NaCl 150mM pH7.4.

La concentración de proteína se calculó usando la absorbancia a 280 nm y un coeficiente de extinción de $1.43 \text{ cm}^{-1} (\text{mg}/\text{mL})^{-1}$.

1.3. Purificación de Factor I

Para la purificación de FI se siguieron los mismos pasos que para la purificación de FB, salvo que la columna de sepharosa empleada llevaba acoplada un mAb anti-FI humano (Ox21).

La concentración de proteína se calculó usando la absorbancia a 280 nm y un coeficiente de extinción de $1.5 \text{ cm}^{-1} (\text{mg}/\text{mL})^{-1}$.

1.4. Purificación de fragmentos activos de C3 (C3b, iC3b, C3c y C3dg)

El fragmento C3b se generó a partir de la activación de C3 por la AP C3-convertasa. El C3 (apartado 1.1) se incubó junto con FB (apartado 1.2) y FD (Calbiochem) en presencia de Mg 5mM a 37°C durante 45 min. A modo de ejemplo, 1mg de C3 se incubó con 500 μg de FB y 1 ng de FD en AP buffer (NaCl 146mM, Veronal sodio 1.8mM, Veronal ácido 3mM, 7mM MgCl_2 ,

10mM EGTA) volumen final 1 mL. Para comprobar que el C3 se había cortado se analizó la migración de la banda de la cadena alpha de C3 en un gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie. En ocasiones, no se cortaba todo el C3 a C3b porque en la muestra de C3 inicial había restos de C3(H₂O) que no puede ser activado a C3b por la AP C3-convertasa. La muestra de C3b se dializó frente a buffer Tris 20mM pH 8.6.

Una vez dializada la muestra, se pasó por una columna MonoQ HR 5/5 y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 40 VC (0-350mM). En esta columna, además de purificar C3b, también separábamos los fragmentos Ba y Bb generados tras el corte de FB. Con las fracciones que habíamos visto que un gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie contenían C3b, se hizo un pool y se filtró con una columna SuperDex 200 en Hepes 10mM, NaCl 150mM pH7.4 . Lo mismo se hizo con aquellas fracciones que contenían Bb y Ba.

Para la generación de iC3b, se digirió el C3b purificado con Factor H (purificado en el laboratorio) y FI a 37°C durante 45 min. A modo de ejemplo, 1mg de C3b se incubó con 100 µg de FH y 30 µg de FI completando hasta un volumen final de 1mL con AP buffer. Una vez se había comprobado que todo el C3b se había cortado a iC3b mediante un gel SDS-PAGE en condiciones de reducción, se seguía el mismo protocolo que para C3b, una MonoQ HR 5/5 y una SuperDex 200.

El fragmento C3dg y C3c se generaron utilizando dos métodos alternativos. En el primero se partió de la molécula de C3b que se incubaba con FH y FI pero a baja concentración de NaCl, 50mM. El otro método consistió en la incubación de iC3b purificado con CR1 y FI a 37°C durante 60 min. A modo de ejemplo, 1mg de iC3b se incubó con 100 µg de CR1 y 50 µg de FI. El resto de la purificación, independientemente del método, fue la misma que para el resto de los fragmentos.

La concentración de proteínas se calculó usando la absorbancia a 280 nm y un coeficiente de extinción de 0.98 cm⁻¹ (mg/mL)⁻¹ que fue el mismo para todos los fragmentos.

2. Generación de anticuerpos monoclonales

La generación de los anticuerpos monoclonales fue llevada a cabo en el laboratorio de Mercedes Domínguez en el Instituto de Investigación Carlos III de Madrid.

Para la generación de anticuerpos anti-FB se inmunizaron ratones deficientes en FB con 20 µg de FB humano emulsionado con CFA. Posteriormente fueron estimulados con la

misma cantidad de FB pero con adyuvante incompleto tres veces más en intervalos de dos semanas. El cribado de los anticuerpos se realizó mediante ELISA, en el que se incubaban los sueros de los ratones en una placa sembrada con FB. A los ratones que resultaron positivos del ELISA se les administró una estimulación adicional con 20 µg de una mezcla de los fragmentos Bb y Ba de FB en PBS. Tres días más tarde, las células del bazo de los ratones que presentaban una respuesta inmune más potente hacia FB se fusionaron con células x63AG8 de mieloma. Los hibridomas se clonaron mediante dilución límite y se expandieron aquellos que presentaban respuesta positiva en el ELISA anti FB.

Los anticuerpos anti-C3 se generaron siguiendo el mismo protocolo, pero en este caso se inmunizaron ratones deficientes en C3 con una mezcla de fragmentos de C3 (C3b, iC3b y C3dg).

Ya en el laboratorio, los clones se crecieron en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco) previamente descomplementado, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Gibco), 2mM de L-glutamina (Gibco) y interleuquina 6 (IL-6). Las células se mantuvieron con 1% de suero y los sobrenadantes se emplearon para purificar los anticuerpos mediante una columna de proteína G-sepharosa (Pharmacia, Upsala, Suecia). Algunos de los anticuerpos también fueron expandidos empleando biorreactores (CELLine CL 350, Integra).

La pureza de los anticuerpos se analizó en un gel SDS-PAGE al 10% y su isotipo se determinó usando el IsoStrip Mouse mAb Isotyping Kit (Roche Applied Science).

3. Generación de Fabs

La generación de los Fab de los diferentes anticuerpos se realizó siguiendo el protocolo de "Pierce Mouse IgG₁ Fab and F(ab')₂ Preparation Kit" (Thermo Scientific) que empleaba ficina si el anticuerpo se trataba de una IgG1 o el protocolo del "Pierce Fab Preparation Kit" (Thermo Scientific) que empleaba papaína si los anticuerpos eran IgG2a e IgG2b.

4. Ensayos de ELISA

4.1. Reactividad de anticuerpos monoclonales

La reactividad de los anticuerpos monoclonales generados frente a los distintos fragmentos de las proteínas C3 o FB se reveló mediante un ELISA indirecto.

Para el ELISA se emplearon placas de 96 pocillos (Costar, Corning Incorporated). Las placas se sembraron con 100 μ L de la proteína diluida en PBS 1X pH 7.4 a 1 μ g/mL a 4 °C durante toda la noche. Para los ELISAs de anticuerpos anti-FB las proteínas que se sembraron fueron FB, Bb y Ba y para los ELISAs de anticuerpos anti-C3, C3, C3b, iC3b, C3c, C3dg y C3 de ratón. Todos los pasos sucesivos llevaron 100 μ L de buffer por pocillo.

Al día siguiente la placa se lavó con 2 veces con buffer de lavado (Tris 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 0.2%) y se bloqueó durante 1 h a T. amb con BSA al 1% diluido en buffer de lavado. Tras el bloqueo, la placa se lavó de nuevo dos veces con buffer de lavado y se incubó con diluciones seriadas (0.5-2 μ g/mL) de los distintos mAb en buffer lavado-BSA 1% durante 1 h a T. amb. Posteriormente, se volvió a lavar de nuevo la placa 4 veces para retirar el exceso de anticuerpo y se incubó durante 30 min a T. amb con un anticuerpo secundario policlonal hecho en cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (DAKO A/S, Dinamarca), diluido 1:1000 en buffer de lavado-BSA 1%. Tras 5 nuevos lavados, la placa se reveló con 4 pastillas OPD (Kem-Em-Tec diagnostics) por cada 12 mL de buffer OPD (ácido cítrico 35mM, Na₂HPO₄ 67mM) y 5 μ L de H₂O₂. Tras 5 min de incubación la reacción se paró añadiendo H₂SO₄ 0.1M y la absorbancia se midió a 492nm en un lector de placas Multiskan RC.

4.2. Niveles de eculizumab libre en sueros

Para medir los niveles de eculizumab libre que presentaban los pacientes HPN se realizó un ELISA indirecto. El procedimiento general de ELISA fue el mismo que el apartado anterior sólo que en este caso, las placas se sembraron con 50 μ L de la proteína purificada C5 (Calbiochem) a 10 μ g/mL. El anticuerpo primario, eculizumab, estaba contenido en las muestras de suero de los pacientes que se incubaron a una dilución 1:8000 en buffer de lavado-BSA 1% durante 90 min a 37 °C. Como secundario se empleó un anti- IgG humano hecho en cabra marcado con peroxidasa (Dako) a una dilución 1:2000. Para la curva de calibración empleé diluciones seriadas de una muestra de eculizumab, obtenida del remanente que queda en los viales que inyectan a los pacientes, del cual conocía la concentración.

4.3. Niveles de C5b9 soluble en plasma

Para medir los niveles de C5b-9 soluble (sC5b9) en los plasmas de los pacientes HPN se realizó un ELISA tipo sándwich. El procedimiento general una vez más es igual al del apartado 2.1, pero en este caso se incluye algún paso adicional. La placa se sembró con un anticuerpo anti-IgG2a de ratón hecho en cabra 1:5000 (Southern Biotech). Tras el bloqueo, las placas se incubaron con el anticuerpo anti-TCC (Terminal Complement Complex) humano hecho en ratón 1:1000 (Hycult) a 37 °C. Pasada 1 h, se incubaron las muestras de plasma diluidas 1:10 en

buffer de lavado-BSA 1% durante otra hora a 37 °C. El sC5b9 se detectó usando sobrenadante de cultivos celulares de un mAb anti-C5 humano, generado en el laboratorio, seguido de la incubación con un anticuerpo anti-IgG1 de ratón hecho en cabra 1:1000 durante 30 min a 37 °C. Como curva de calibración se emplearon diluciones seriadas de suero humano con concentraciones de sC5b9 conocidas.

5. Electroforesis en geles de acrilamida y Western Blot

La electroforesis en geles SDS-PAGE se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Todos los geles que aparecen en esta tesis están al 10% de acrilamida/bisacrilamida. Las muestras se cargaron en buffer de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS y 0.02% de azul de bromofenol) y cuando se querían cargar en condiciones de reducción se añadía al buffer 0.26 mM DTT .

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaban o bien mediante Western Blot (WB) o mediante su tinción con azul de coomassie.

Para teñir las proteínas con coomassie, el gel se sumergió en buffer Coomassie (40% MeOH, 7% ac. acético, azul de Coomassie R-250) en agitación. Tras teñir el gel, para eliminar el fondo y sólo visualizar las bandas de proteínas, el gel se lavó varias veces con solución de desteñido (27% MeOH, 6.6% ac. acético).

En el caso del WB, para la transferencia, se empleó el equipo de BioRad Trans-Blot Turbo Transfer System, que emplea sus propios búferes y membranas de PVDF para hacer una transferencia rápida semiseca. Tras la transferencia, la membrana se incubó con la solución de bloqueo (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, tween-20 0.05%, BSA 3%) durante 1 h a T. amb. en agitación. Transcurrido este tiempo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en la misma solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche en agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó con 3 lavados de 10min con la solución de lavado (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, tween-20 0.05%) para eliminar los restos de anticuerpo. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario marcado con HRP 30 min a T. amb. en agitación. Tras otros 5 lavados de 10min con la solución de lavado, la membrana se reveló con un reactivo quimioluminiscente (Clarity Western ECL Substrate) en película fotográfica (Kodak) o empleando el ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad).

Anticuerpos primarios empleados:

Policlonal anti-C3 humano hecho en conejo (generado en el laboratorio).

Dilución 1:2000.

Policlonal anti-FB humano hecho en cabra (The Binding Site) Dilución 1:2000.

6. Ensayos de activación de C3 e inactivación de sus fragmentos derivados

6.1. Ensayo de activación de C3

Este ensayo se realizó para evaluar si los anticuerpos eran capaces de inhibir la activación de complemento por la vía alternativa. C3, C3b o una mezcla de ambas (1µg) junto con FB (1µg) se preincubaron en presencia de dos concentraciones de los diferentes anticuerpos (concentración equimolar con el antígeno y dos veces molar) en AP buffer durante 10 min a 37°C. La muestra de C3 contenía suficiente C3(H₂O) como para desencadenar la reacción. Transcurrido ese tiempo se añadió el FD (0.001µg) que se incubó durante otros 30 min. Las reacciones se cargaron en un gel al 10% SDS-PAGE en condiciones reducidas y se tiñeron con coomasie.

6.2. Ensayo de activación de C3 en presencia de factores nefríticos de C3 (C3NeFs)

Para comprobar si los mAbs anti-C3 eran capaces de inhibir la activación de complemento en presencia de C3NeFs, incubamos un suero control (NHS) con un exceso de C3NeFs y una cantidad molar de mAb equivalente a la del C3 presente en el suero en AP50 durante 30 min a 37°C. En este ensayo empleamos como control negativo el NHS incubado con IgGs purificadas de un individuo control y el NHS incubado con C3NeFs y EDTA. Como control positivo incluimos el NHS en presencia de C3NeFs y de un mAb no relacionado con complemento. Tras la incubación se cargaron 16 µL de una dilución 1:1500 de cada una de las muestras en un gel al 10% SDS-PAGE en condiciones reducidas, y se realizó un WB empleando como Ac primario el anti-C3 humano hecho en conejo (Dil 1:2000) y Ac secundario anti-IgG de conejo hecho cabra (Dil 1:2000).

6.3. Ensayo de inactivación de C3b

Para evaluar si los anticuerpos eran capaces de inhibir la inactivación de C3b a iC3b preincubamos C3b (1 μ g) en presencia de dos concentraciones de los diferentes anticuerpos (concentración equimolar con el antígeno y dos veces molar) en AP buffer durante 10 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo se añadió FH (100ng) y FI (50ng) que se incubaron durante otros 30min. Las reacciones se cargaron en un gel al 10% SDS-PAGE en condiciones reducidas y se tiñeron con coomassie.

6.4. Ensayo de inactivación de iC3b

Estudiamos si el anticuerpo que reconocía específicamente iC3b y C3dg (C3-12.2) inhibía la inactivación de iC3b a C3dg. iC3b (1 μ g) se incubó en presencia de dos concentraciones del anticuerpo (concentración equimolar con el antígeno y dos veces molar) en AP buffer durante 10 min a 37°C. Pasado los 10 min se añadió a la reacción CR1 (700ng) y FI (100ng) e incubamos durante 30 min más. Las reacciones se cargaron en un gel al 10% SDS-PAGE en condiciones reducidas y se tiñeron con coomassie.

7. Estudios por resonancia de plasmón en superficie

Todos los estudios se llevaron a cabo en un equipo de Biacore X100 (GE Healthcare). Todos los datos fueron tratados con una doble referencia, se les substrajo tanto los datos de la celda de referencia (celda sin ligando) como los del blanco (buffer sin analito).

7.1. Caracterización afinidad antígeno-anticuerpo

Para calcular las constantes de afinidad (KD) que presentaban los diferentes anticuerpos hacia sus antígenos empleamos el análisis de single-cycle kinetics o multi-cycle kinetics. Alrededor de unas 100 unidades de resonancia (RUs) del anticuerpo a estudiar (ligando) fueron capturadas en un chip de CM5 siguiendo el protocolo de captura del kit de “captura de anticuerpos de ratón” (GE Healthcare). Tras haber conseguido una unión estable, se fluyeron sobre él 5 inyecciones consecutivas de concentraciones crecientes del analito (FB, C3b o iC3b) diluidas en 20mM Hepes, 150mM NaCl, 0.005% T-20 de 150 s cada una y la unión de la última inyección se dejó decaer durante 1300 s. El chip fue regenerado con dos ciclos de glicina pH: 1.7. Los datos fueron ajustados al modelo de interacción 1:1 usando el software de evaluación

de Biacore (versión 4.1; GE Healthcare). Sólo en el caso del anticuerpo C3-42.3 las constantes fueron calculadas a partir del análisis de afinidad en el estado de equilibrio.

7.2. Formación de la proconvertasa de C3 en presencia del FB28.4.2

Para estudiar si el FB28.4.2 inhibía la formación de la AP C3-proconvertasa inmovilizamos un chip CM5 con 1000 RUs de C3b mediante enlace amino. Sobre este chip, se fluyó durante 120 s FB o una mezcla preincubada de FB con un exceso 4 veces molar de FB28.4.2 y se dejó decaer la unión durante 300 s. La superficie del chip fue regenerada con 20mM EDTA.

8. Ensayos hemolíticos

8.1. CH50

Con el ensayo de CH50, podemos cuantificar la capacidad de un suero para iniciar la activación del complemento por la vía clásica y lisar los eritrocitos. Para este ensayo empleamos eritrocitos de carnero (Real Laboratory, Durviz). Los eritrocitos fueron lavados tres veces con buffer GVB (NaCl 146mM, Veronal sodio 1.8mM, Veronal ácido 3mM, Gelatina 0.1%)/EDTA 10mM, pH 7.4 y resuspendidos en ese mismo buffer a una concentración de 1×10^9 células/mL (OD_{541} :0.37). Para poder activar la vía clásica, sensibilizamos los eritrocitos con amboceptor (Siemens) para recubrirlos de IgG o IgM. Para ello, titulamos la cantidad de amboceptor mediante la incubación de diluciones seriadas de amboceptor con una concentración fija de eritrocitos. La concentración de amboceptor elegida sería la máxima dilución que no causara aglutinación de los eritrocitos. Esta dilución se incubó durante 30min a 37 °C en continua agitación con los eritrocitos. Tras la incubación, los eritrocitos se centrifugaron a 2000g 5min, se lavaron un par de veces con GVB/EDTA y los almacenamos hasta una semana a 4 °C.

El día del ensayo, los eritrocitos se lavaron un par de veces con buffer GVB^{2+} (GVB, $CaCl_2$ 0.15mM, $Mg Cl_2$ 1mM) y se resuspendieron en ese buffer a una concentración de 1×10^9 /mL. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo curvo (Thermo Fisher Scientific). 50 μ L de eritrocitos sensibilizados se incubaron junto con 50 μ L de las diluciones seriadas de suero, empezando con una dilución 1/10, durante 30min a 37 °C en continua agitación. Las diluciones se hicieron por duplicado y se emplearon 6 diluciones seriadas de cada suero a analizar. Finalizados los 30min, la reacción se bloqueó con 100 μ L de GVB/EDTA y

la placa se centrifugó a 1800 rpm durante 5min a 4°C. Los sobrenadantes se pasaron a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar) y se leyeron a 414nm. Como blanco empleamos eritrocitos con suero en GVB/EDTA y los eritrocitos con agua como 100% de lisis. Como control se empleó un suero humano normal (NHS) diluido de la misma forma que las muestras.

8.2. AP50

Con el ensayo de AP50 evaluamos la capacidad de un suero para lisar los eritrocitos de conejo mediante la activación de la vía alternativa. Los eritrocitos fueron lavados un par de veces en GVB/Mg (GVB 20%, D-glucosa 3%, EGTA 10mM, Mg Cl₂ 7mM, pH 7.4) y se llevaron a una concentración de 1X10⁸ células/mL (OD₄₁₄:0.37) en ese mismo buffer. Antes de comenzar el ensayo titulamos la concentración de suero de un individuo control a utilizar. Para ello incubamos una cantidad fija de eritrocitos con cantidades crecientes de suero. Elegimos una concentración de suero del 2.5% ya que era la mínima cantidad capaz de conseguir una lisis del 100% de los eritrocitos. En el ensayo, 100 µL de eritrocitos (1X10⁸/mL) en GVB/Mg se incubaron en un tubo que contenía 100 µL de suero al 5% en GVB/Mg durante 30min a 37 °C con agitación ocasional. Para evaluar la eficacia de los mAbs en inhibir la activación de la vía alternativa se añadieron a esos tubos concentraciones crecientes de los mAbs y de su fragmento Fab. Los experimentos se realizaron por triplicado. La reacción se paró añadiendo 2 mL de PBS a 4 °C y los tubos se centrifugaron a 1000g durante 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes se leyeron a 414nm. Los eritrocitos con suero y GVB/EDTA se emplearon como blanco y los eritrocitos con agua como 100% de lisis.

Se realizó una variación de este ensayo empleando eritrocitos de carnero y el suero de un paciente de SHUa con una mutación en la región C-terminal de FH, FH -W1183L. Previo a la realización del ensayo se hizo una curva de titulación del suero SHUa con los eritrocitos. Se eligió la concentración del 20% de suero ya que era la cantidad necesaria para lisar el 80% de los eritrocitos. Para el resto del ensayo se siguieron las condiciones descritas para el AP50 con los eritrocitos de conejo.

8.3. Ham Test

El ensayo de Ham test (Ham and Dingle, 1939) se utilizaba en los laboratorios para identificar mediante un ensayo *in vitro* a pacientes con eritrocitos HPN. Para la realización de este ensayo, los eritrocitos del paciente se incubaban en presencia de un suero acidificado. En estas condiciones, el complemento se activa y los eritrocitos HPN, sin CD55 ni CD59, se lisan.

Nosotros nos hemos valido de este ensayo para estudiar la capacidad de los mAb para inhibir la activación de la vía alternativa y prevenir la lisis de los eritrocitos HPN. El ensayo es básicamente como un AP50; los eritrocitos de pacientes HPN (4% v/v final) se incubaron con un 50% de NHS acidificado al 9% con HCl 0.2M durante 1 h a 37 °C y en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes mAbs a testar.

8.4. Ensayos hemolíticos con sueros de otras especies

Los ensayos hemolíticos empleando sueros de otras especies diferentes a la humana se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos. En concreto, para el ensayo hemolítico empleando suero de cerdo y rata, se realizó un AP50 con eritrocitos de conejo empleando un 7.5% de suero en el caso de la rata, y un 10% en el caso del cerdo. Para el ensayo empleando suero de ratón, los eritrocitos de conejo tuvieron que ser sensibilizados con un anticuerpo anti-eritrocitos de conejo hecho en ratón. El resto del ensayo se realizó como un CH50 empleando un 4% de suero.

9. Citometría de flujo

9.1. Depósito de C3 y CD59 sobre los eritrocitos

Los eritrocitos de los pacientes HPN se obtuvieron a partir de la centrifugación de muestras de plasma-EDTA. Los eritrocitos se lavaron varias veces con PBS 1X hasta que el sobrenadante estuviera limpio y se almacenaron en buffer ACD-A a 4 °C hasta una semana. Empleamos un mAb anti-CD59 hecho en ratón y marcado con ficoeritrina (Sigma) para identificar el porcentaje de eritrocitos HPN que había en las muestras y un policlonal anti-C3 hecho en conejo, generado en el laboratorio, que reconocía C3, C3b, iC3b y C3dg para ver el depósito de C3 sobre los eritrocitos. Ambos fueron usados simultáneamente en citometría de flujo de doble color. Para la citometría, 25 µL de una suspensión en PBS de eritrocitos al 1% fue incubada con 100 µL del anticuerpo anti-C3 a 1 µg/mL durante 30min a T. amb. Tras un par de lavados con PBS, los eritrocitos se incubaron con 100 µL de un anti-IgG de conejo marcado con Alexa 488 (Lifetechnologies) 1:2000y con una dilución 1:50 del anti-CD59 durante 30min a T. amb y protegidos de la luz. Las muestras fueron procesadas en un analizador Beckman Coulter XL utilizando un laser de argón con una onda de excitación a las 488 nm y recogiendo la señal a 525 nm (Alexa 488) y a 575 nm (ficoeritrina).

9.2. Inhibición del depósito de C3 en eritrocitos de conejo

Los eritrocitos de conejo se incubaron con NHS en presencia de FB28.4.2 o de eculizumab, siguiendo las condiciones descritas en el apartado 8.2 de Materiales y métodos. Una vez lavados los eritrocitos, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior 9.1, la mitad de los eritrocitos se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-C3 humano y la otra mitad con el mAb C3-12.2, que reconoce los fragmentos iC3b y C3dg, y se analizó el depósito de C3 por citometría.

10. Genotipado

El ADN de los pacientes HPN se extrajo a partir de los glóbulos blancos de sangre periférica.

Los pacientes HPN fueron genotipados para el polimorfismo en el gen de *CR1* que permite discriminar entre el alelo *CR1-H* y el *CR1-L* mediante secuenciación automática a partir de fragmentos amplificados por PCR empleando el kit CERTAMP (Biotools B&M Labs).

Los oligonucleótidos empleados fueron:

Región	Oligo FW	Oligo RV	Tamaño (pb)
HindIII RFLP (intrón 27)	GGGTTCTTGCTCTTGACTTC	GAATGCTGGACTGTCTTGC	849
H120R (exón 22)	CCTTGTGCTAGGGAGAATTG	CCAGAGGTTAATCTCCCTG	614
P1827R (exón 33)	TCCAGGAACACTGTCTTTG	TGACAGTTACAGCAAAGCC	565

También fueron genotipados para el polimorfismo en *C5* (Nishimura, et al., 2014) que se asocia con una baja respuesta al tratamiento con eculizumab, el R885H en el exón 21.

Región	Oligo FW	Oligo RV	Tamaño (pb)
R885H (exón 21)	GCAGGAGAATTGCTTGAATC	GCACGATTCAGACTTACAGAA	554

La secuenciación se llevó a cabo por la empresa Secugen, en un secuenciador automático ABI 3730 utilizando el kit de terminadores fluorescentes (Applied Biosystems, Foster City, C.A).

Resultados

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a proteínas de complemento con potenciales aplicaciones en terapia y diagnóstico.

El primer objetivo de mi tesis fue generar y caracterizar mAbs capaces de inhibir la activación de la AP con el objeto de que pudieran ser utilizados como terapia en patologías del complemento. Para ello, generamos mAbs frente a los dos componentes de la AP C3-convertasa, C3 y FB.

Todos los anticuerpos se generaron en ratones knock out para la proteína con la que dichos animales iban a ser inmunizados. La razón de ello fue evitar la tolerancia frente aquellos dominios en la molécula que presentaran mayor relevancia funcional, que son precisamente aquellos más conservados durante la evolución.

La caracterización inicial de los distintos anticuerpos monoclonales se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA y Western Blot que nos han permitido determinar cuál era el fragmento que reconocía cada mAb. La selección inicial de aquellos mAbs capaces de bloquear activación de C3 se realizó mediante ensayos in vitro utilizando proteínas purificadas y ensayos hemolíticos con eritrocitos de conejo y carnero. Con estos ensayos podíamos aproximar el mecanismo de inhibición de cada anticuerpo y la eficacia con la que producía esta inhibición, pero para conocer con detalle el mecanismo molecular por el cual inhibían la activación de complemento estos mAbs nos servimos de los ensayos de resonancia de plasmón en superficie y de los modelos tridimensionales generados a partir de las imágenes de microscopía electrónica. Por último, para probar la posible utilidad de estos mAbs como agentes terapéuticos, los testamos en diferentes modelos de enfermedades de desregulación de complemento. Para ello, empleamos varios modelos in vitro tanto de SHUa utilizando células HMEC-1 o eritrocitos de carnero, como de HPN o C3G, e incluso para uno de los mAbs empleamos un modelo in vivo de miastenia gravis.

1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a Factor B

1.1 Purificación de antígenos: FB, Bb y Ba

El FB y sus fragmentos proteolíticos Bb y Ba con los que iban a ser inmunizados los ratones se purificaron en el laboratorio tal y como se detalla en el apartado 1.2 de Materiales y métodos.

1.2 Generación de anticuerpos monoclonales frente a FB

Los anticuerpos monoclonales se generaron en el laboratorio de Mercedes Domínguez (ISCI) inmunizando con FB y sus fragmentos proteolíticos Bb y Ba a ratones deficientes en FB (apartado 2 de Materiales y métodos). Allí se realizó un primer screening para identificar aquellos hibridomas que produjeran anticuerpos con fuerte título hacia la proteína FB.

Al laboratorio nos llegaron 10 hibridomas, los cuales se expandieron, y a partir de los sobrenadantes purificamos los distintos mAbs. Para conocer cuál era el fragmento de la molécula de FB que reconocían se utilizaron los fragmentos Bb y Ba purificados tanto en ELISA como en WB (apartado 4.1 y 5 Materiales y métodos). Además, en el ensayo de WB se incluyó una muestra de plasma-EDTA de ratón. Todos los mAbs excepto uno reconocían el fragmento Ba de FB, lo cual era un resultado prometedor ya que la interacción entre este dominio y C3b es fundamental para la formación de la AP C3-convertasa, luego su bloqueo podía inhibir la activación del complemento. Cinco de los mAbs reconocían el FB de ratón, sugiriendo que el epítipo que estaban reconociendo podía ser un residuo conservado y por tanto con relevancia funcional. En la tabla 1 se resumen los datos de esta caracterización inicial.

Tabla 1. Resumen reactividad de la colección mAbs anti-FB.

mAb	Isotipo	WB Humano-NR	WB Humano-R	WB ratón-NR	WB ratón-R	Elisa
45.1.2	IgG2a	FB/Bb	FB/Bb	x	FB	FB/Bb
32.1.1	IgG2b	FB/Ba	x	FB	x	FB/Ba
10.1.2	IgG2a	FB	FB/Ba	FB	FB	FB/Ba
2.1.2	IgG2b	FB/Ba	x	x	x	FB/Ba
12.1.2	IgG2b	FB	x	x	x	FB/Ba
24.1.2	IgG2b	FB	x	x	x	FB/Ba
27.3.1	IgG2a	FB	FB	x	x	FB/Ba
37.3.1	IgG2a	FB/Ba	FB	FB	x	FB/Ba
49.1.2	IgG2b	FB	x	x	x	FB/Ba
28.4.2	IgG2b	FB/Ba	x	FB	x	FB/Ba

La caracterización se hizo mediante WB en condiciones de no reducción (NR) y reducción (R) y por ELISA.

1.3 Caracterización bioquímica y funcional del FB28.4.2

1.3.1 El FB28.4.2 bloquea la activación de la AP

Para seleccionar aquellos posibles inhibidores de la activación de la vía alternativa estudiamos la capacidad de los anticuerpos para bloquear la formación de la AP C3-convertasa en un ensayo in vitro empleando proteínas purificadas (apartado 6.1 Materiales y métodos). La AP C3-convertasa está compuesta por una molécula de C3b y otra de Bb. Para su formación, el C3b/C3(H₂O) se une a la proteína FB que será posteriormente proteolizada por la enzima FD

generando dos fragmentos; Bb (60 KDa) que queda unido a C3b y Ba (30 KDa) que se libera al medio. En un primer ensayo analizamos la capacidad de los mAbs para bloquear el corte de FB a Bb y Ba por FD. Para ello, pre-incubamos el FB con los diferentes mAbs y añadimos a la reacción C3b y FD. Tras la incubación, la reacción se cargó en un gel SDS-PAGE en condiciones de reducción y se analizó el patrón de bandas de las proteínas para ver si se había producido el corte. Sólo uno de los mAbs había sido capaz de inhibir el corte de FB, el FB28.4.2. En la Figura 1.A se ilustra como en presencia de cantidades crecientes del Fab FB28.4.2, las bandas correspondientes a los fragmentos proteolíticos Bb y Ba van desapareciendo mientras que se va visualizando de manera creciente la banda correspondiente al FB.

Era razonable pensar, que al no cortarse el FB tampoco se estuviera formando la AP C3-convertasa. Para estudiarlo, repetimos el ensayo anterior pero esta vez en presencia de C3 en vez de C3b (Figura 1.B). En estas condiciones, la presencia de pequeñas cantidades de C3(H₂O) en la muestra son suficientes para formar una primera AP C3-convertasa que proteolizará el C3 a C3b. Este nuevo C3b formará más AP C3-convertasa que cortará más C3 (loop de amplificación) llegando a consumirse todo el C3 de la reacción. Observamos, que en las reacciones en las que se había añadido el FB28.4.2 la cadena α de C3 no se cortaba a C3b, luego el FB28.4.2 estaba actuando bloqueando la formación de la AP C3-convertasa y por tanto la activación de C3.

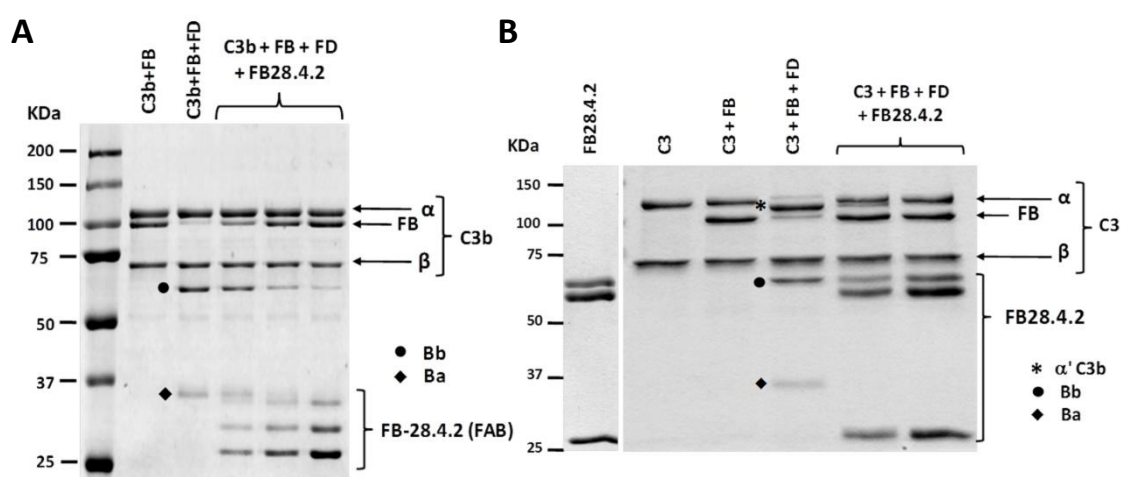


Figura 1. El mAb FB28.4.2 inhibe la formación de la AP C3-convertasa. A) Gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie para analizar el corte de FB en presencia de C3b, FD y concentraciones crecientes del Fab FB28.4.2. B) Gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie para analizar el corte de C3 en presencia de FB, FD y dos concentraciones de FB28.4.2.

1.3.2 El FB28.4.2 reconoce el dominio de Ba de FB con alta afinidad

A la vista de los resultados anteriores, como el FB28.4.2 era el único mAb capaz de inhibir la formación de la AP C3-convertasa, el resto de la caracterización se continuó únicamente con este mAb. El FB28.4.2 reconocía el fragmento Ba de FB tanto por ELISA como por WB en condiciones de no reducción (Figura 2.A). Además, este mAb resultó de gran interés ya que era capaz de reconocer el FB no sólo en humanos, sino también en otras muchas especies (Figura 2.B), lo que nos revelaba que el FB28.4.2 estaba reconociendo un epítipo en Ba altamente conservado en la evolución y también nos abría la puerta a su posible uso en modelos animales.

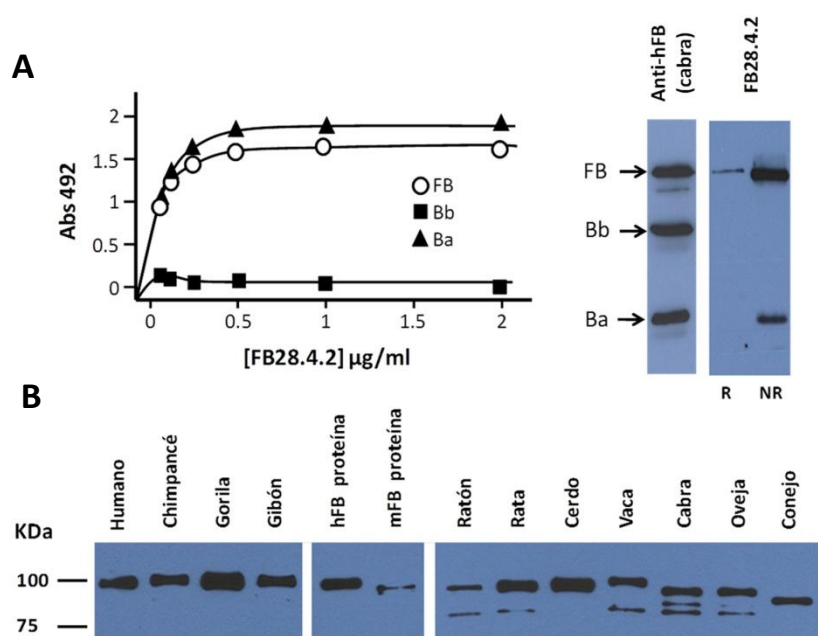


Figura 2. El mAb FB28.4.2 reconoce un epítipo en Ba muy conservado. A) ELISA y WB usando las proteínas purificadas FB, Bb y Ba. Para el WB las 3 proteínas fueron mezcladas antes de ser cargadas en el gel de SDS-PAGE. También se incluyó como control positivo un Ab policlonal capaz de reconocer los dos fragmentos de FB (anti-hFB hecho en cabra). R, condiciones de reducción. NR, condiciones de no reducción. B) WB realizado con muestras de plasma-EDTA (0.1 μL) de diferentes mamíferos. Como control se incluyeron muestras de FB purificado (0.08 μg) humano (hFB) y de ratón (mFB).

Empleando la técnica de resonancia de plasmón en superficie (RPS) calculamos las constantes de afinidad del anticuerpo hacia FB humano y de ratón (Figura 3)(apartado 7.1 Materiales y métodos). En un chip de captura de IgG de ratón inmovilizamos el FB28.4.2 y fuimos sobre él concentraciones crecientes de ambos FB. La K_D (afinidad) que obtuvimos para el FB humano era $K_D: 3.55 \cdot 10^{-9}$ M, lo cual nos estaba indicando una alta afinidad hacia el ligando, mientras que la K_D para el FB de ratón era dos órdenes de magnitud más alta ($K_D: 6 \cdot 10^{-7}$ M), mostrando por tanto menos afinidad hacia el FB de ratón. Estos datos apoyaban los resultados que ya habíamos obtenido mediante Western blot, en los que el FB28.4.2 reconocía muy bien el FB en todas las especies menos en ratón.

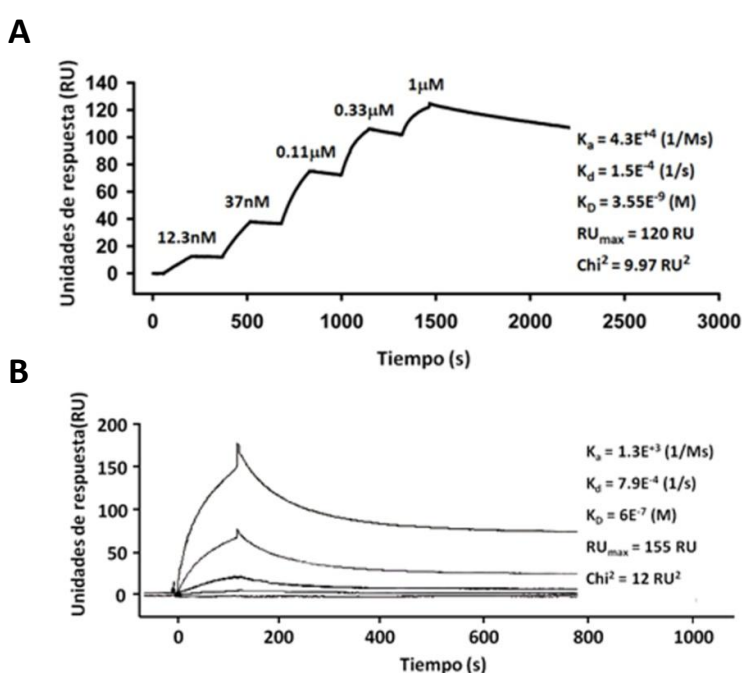


Figura 3. EL FB28.4.2 reconoce con alta afinidad el FB humano. A) Sensograma representativo de un ensayo syngle-cycle kinetics para calcular la afinidad de interacción entre el FB humano y el FB28.4.2. En un chip CM5 se inmovilizaron 100 RUs del FB28.4.2 usando el kit de captura de IgG de ratón y se fluyeron 5 concentraciones consecutivas crecientes del FB humano (12.3 nM a 1 μ M). B) Sensograma representativo de un ensayo multi-cycle para calcular la constante de afinidad entre el FB de ratón y el FB28.4.2. En cada ciclo, el FB28.4.2 fue inmovilizado en un chip CM5 usando el kit de captura de IgG de ratón, y sobre él se fluyó el FB de ratón (8.6 nM a 0.7 μ M, diluciones seriadas 1:3). Entre cada ciclo hubo una regeneración con glicina 10mM pH 1.7. Los ensayos fueron realizados por duplicado obteniendo idénticos resultados.

1.3.3 El FB28.4.2 inhibe la formación de la AP C3-proconvertasa

El dominio Ba de FB es una región fundamental para la formación de la AP C3-convertasa; por un lado participa en las interacciones iniciales con la molécula C3b mediante

su unión con los dominios CUB, N-terminal y MG7 (Torreira, et al., 2009) y además, este dominio contiene el sitio de corte por FD (la región linker). Como el anticuerpo FB28.4.2 estaba reconociendo esta región Ba, nos planteamos dos posibles mecanismos de inhibición. Uno primero en la que el anticuerpo actuara impidiendo la interacción entre FB y C3b y uno segundo en el que el anticuerpo se uniera a FB bloqueando el acceso de FD a la región linker.

Con el fin de conocer el mecanismo por el cual estaba inhibiendo el FB28.4.2, analizamos la formación de la AP C3-proconvertasa en presencia del anticuerpo mediante en un ensayo por RPS (apartado 7.2 Materiales y métodos).

Cuando sobre un chip inmovilizado con C3b se fluye FB, el FB se une a C3b formando la AP C3-proconvertasa (C3bB). Esta unión es muy inestable, y va decayendo a medida que se deja de fluir FB sobre el chip. La aplicación de EDTA al chip disocia por completo este complejo. Observamos que al preincubar el FB con el Fab FB28.4.2 no había interacción entre C3b y FB, inhibiendo por tanto la formación de la AP C3-proconvertasa (Figura 5). Con estos resultados se ponía en evidencia que el FB28.4.2 actuaba bloqueando la unión entre FB y C3b.

Empleando este mismo ensayo, tratamos de determinar si el FB28.4.2 era capaz de disociar la AP C3-proconvertasa, pero debido a la rápida corta vida media de este complejo, fuimos incapaces de demostrarlo, ya que para cuando quisimos inyectar el FB28.4.2, el complejo ya se había disociado.

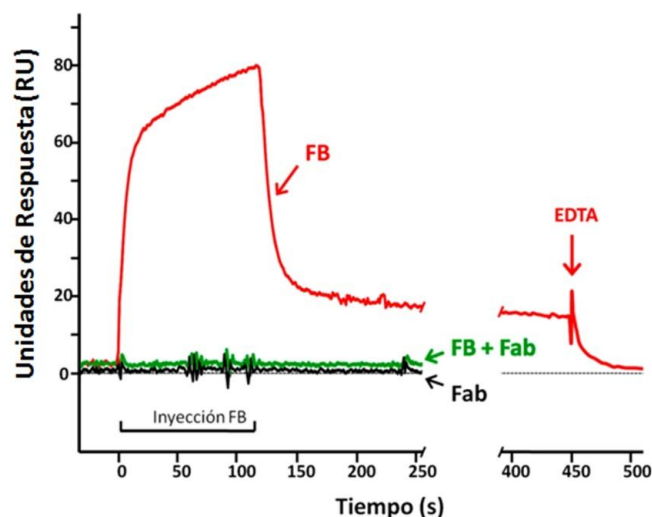


Figura 5. El mAb FB28.4.2 bloquea la unión de FB a C3b. Sensograma que representa un ensayo de RPS de formación de la AP C3-proconvertasa en presencia o ausencia del Fab FB28.4.2. Sobre la superficie de un chip de CM5 recubierta con 1000RU de C3b inmovilizado se fluyó FB (rojo), Fab FB28.4.2 (negro) o una mezcla preincubada del FB con un exceso 4 veces molar del FabFB28.4.2 (verde). Para disociar la AP C3-proconvertasa se empleó una inyección de EDTA. El experimento fue realizado por duplicado con idénticos resultados.

Como conclusión, los resultados de la caracterización bioquímica y funcional mostraban que el FB28.4.2 se unía al fragmento Ba del FB humano con una alta afinidad, y que al hacerlo, bloqueaba la formación de la AP C3-proconvertasa y por tanto la activación de la AP. Todos estos datos ponían en valor el uso del FB28.4.2 como futuro agente terapéutico.

1.4 El FB28.4.2 inhibe la activación del complemento en diferentes modelos de enfermedad asociados a desregulación en complemento

Una vez habíamos demostrado mediante diferentes ensayos in vitro que el anticuerpo FB28.4.2 era capaz de inhibir la activación del complemento, decidimos que el siguiente paso era probar la eficacia del anticuerpo en distintos modelos de enfermedad causados por desregulación del complemento.

1.4.1 El FB28.4.2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos de carnero en un modelo in vitro de SHUa

Los ensayos hemolíticos son ensayos que se emplean comúnmente para medir la actividad lítica de un suero, es decir, la cantidad de suero que se requiere para lisar el 50% de los eritrocitos bajo unas determinadas condiciones. En nuestro caso, nos vamos a servir de estos ensayos para determinar la eficiencia con la que el FB28.4.2 inhibe la lisis de los eritrocitos.

El AP50 es un ensayo dependiente únicamente de la activación de la vía alternativa (apartado 8.2 de Materiales y métodos). En este ensayo, se incuban eritrocitos de conejo en presencia de NHS. El FH del NHS no reconoce la superficie de los eritrocitos de conejo, y como consecuencia el complemento del suero lisa los eritrocitos. Como se aprecia en la figura 4.A, la adición de cantidades crecientes de FB28.4.2 en el NHS producía una disminución progresiva de la lisis de los eritrocitos de conejo. El 100% de la inhibición se alcanzó a concentraciones de FB28.4.2 (0.04 μ M) que eran equimolares con las del FB presente en el suero (0.05 μ M). El mismo ensayo fue repetido empleando el Fab FB28.4.2, y tal y como había ocurrido con el FB28.4.2 completo, la presencia de cantidades crecientes del Fab FB28.4.2 en el suero reducía la lisis llegando a bloquearla por completo a una concentración de 0.07 μ M (Figura 4.B).

Con el fin de estudiar los posibles modelos animales en los que testar el FB28.4.2, se realizó un AP50 empleando suero de ratón, rata y cerdo. Utilizando unas condiciones similares, tal y como se observa en la figura 4. C, el anticuerpo FB28.4.2 era capaz de bloquear

eficazmente la lisis de los eritrocitos provocada por el suero de rata y cerdo pero no el de ratón.

En el laboratorio tenemos puesto a punto un ensayo capaz de detectar deficiencias en la regulación de FH en sueros de pacientes (Sanchez-Corral, et al., 2004). En este ensayo se emplean eritrocitos de carnero, que a diferencia de lo que ocurre con los eritrocitos de conejo, sí que unen en su superficie el FH de suero humano, protegiéndose así de la lisis mediada por complemento. En el caso de pacientes con deficiencias o mutaciones en la región C-terminal de FH, los eritrocitos no podrán recubrirse del FH del suero y se lisarán. Empleando el suero de un paciente de SHUa con una mutación en la región C-terminal de FH (FH-W1183L), valoramos la eficacia del FB28.4.2 en controlar la activación de un suero y por tanto de inhibir la lisis de los eritrocitos. Como había ocurrido en los ensayos anteriores, la presencia de cantidades crecientes del FB28.4.2 en el suero bloqueaba progresivamente la lisis de los eritrocitos. La inhibición completa de la lisis se alcanzó a concentraciones equimolares con el FB presente en el suero (FB: 0.3 μ M, FB28.4.2: 0.28 μ M)(Figura 4. D).

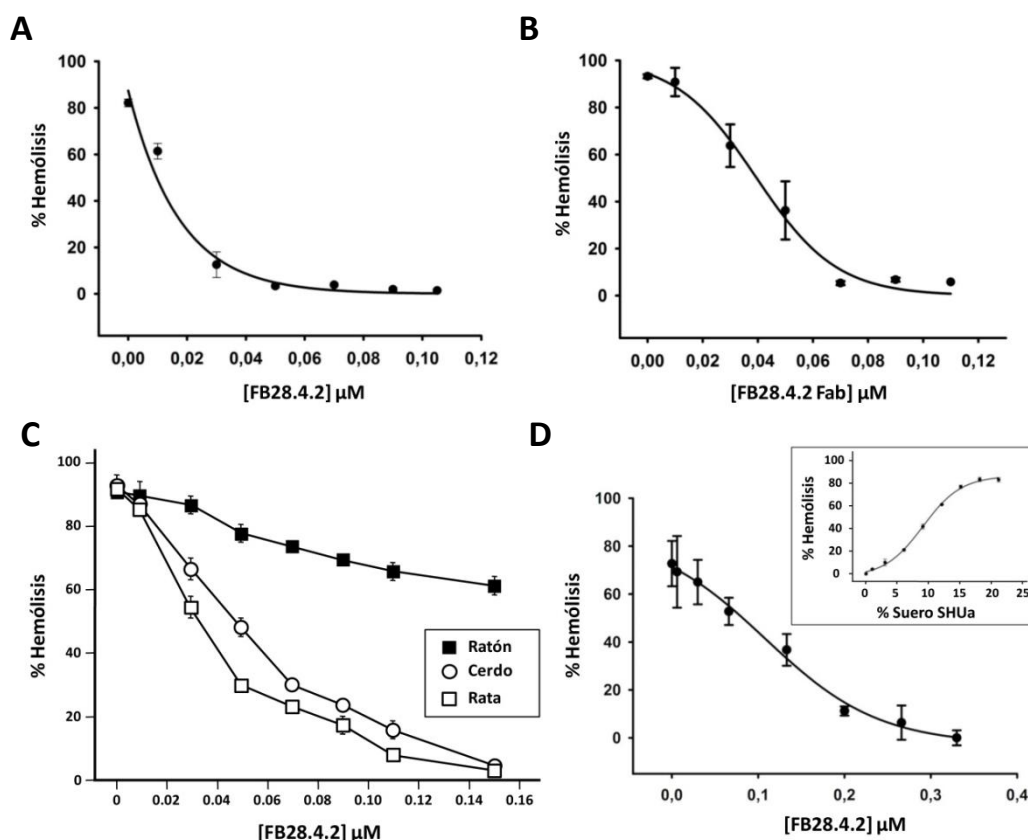


Figura 4. El mAb FB28.4.2 inhibe la lisis mediada por complemento de eritrocitos de conejo y carnero. A) Ensayo hemolítico AP50 empleando un NHS y concentraciones crecientes del FB28.4.2. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. B)

Ensayo AP50 empleando un NHS y concentraciones crecientes del Fab FB28.4.2. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. C) Ensayo hemolítico AP50 empleando suero de ratón, rata y cerdo. Para el ensayo con suero de ratón los eritrocitos de conejo tuvieron que ser previamente sensibilizados. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. D) Ensayo hemolítico con eritrocitos de carnero realizado con el suero de un paciente con SHUa portador de la mutación en FH W1183L y cantidades crecientes del FB28.4.2. En el recuadro pequeño se muestra la titulación del suero SHUa con los eritrocitos. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados mostraban que sólo era necesaria la presencia de concentraciones equimolares de FB28.4.2 con el FB del suero para bloquear completamente la activación del complemento, demostrando por tanto la gran efectividad del anticuerpo.

1.4.3 El FB28.4.2 bloquea el depósito de fragmentos de C3 y de C5b-9 sobre células HMEC-1 en un modelo in vitro de SHUa

Otro de los modelos sobre el que se estudió la efectividad del FB28.4.2 fue en un modelo in vitro de SHUa realizado en el laboratorio de Marina Noris en Bérgamo. Para este ensayo se emplearon células HMEC-1 activadas con ADP. La activación con ADP pretende mimetizar las condiciones de un endotelio alterado, produciéndose una excitosis masiva de P-selectina, una molécula de adhesión que sirve tanto de anclaje como de activador de C3 (Morigi, et al., 2011). Numerosos estudios a lo largo de los años han demostrado que las mutaciones y polimorfismos en genes que codifican proteínas complemento en pacientes de SHUa conducen a una menor protección celular de la lisis mediada por complemento (Rodríguez de Cordoba, et al., 2014). De manera, que cuando estas células HMEC-1 se incuban con el suero de un paciente de SHUa, su superficie se recubre de fragmentos de C3 y de complejo C5b-9 que son observados por inmunofluorescencia mediante anticuerpos específicos frente a C3c y C5b-9, cosa que no ocurre cuando este ensayo se realiza con un NHS (Noris, et al., 2014).

Para analizar el efecto del FB28.4.2 frente al daño tisular mediado por complemento se incubaron las células HMEC-1 con el suero de un paciente de SHUa portador de una mutación en el gen de *CFH* en presencia del anticuerpo FB28.4.2. Además, como control se incluyó el potente inhibidor sCR1, que previamente ya había mostrado su eficacia en este tipo de ensayos (Noris, et al., 2014). El análisis por inmunofluorescencia mostró que el FB28.4.2 impedía el depósito tanto de fragmentos de C3 como de C5b-9 sobre la superficie celular, encontrando los mismos depósitos que se observaban cuando las células se incubaban con un NHS (Figura 7). Resultados similares se observaron con el inhibidor sCR1.

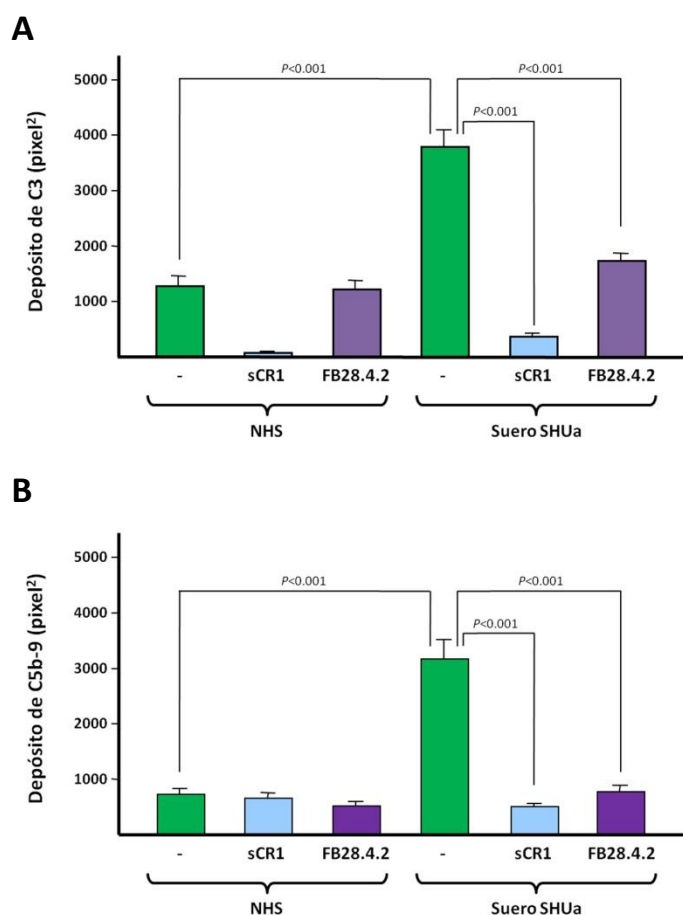


Figura 7. El FB28.4.2 inhibe el depósito de C3 y C5b-9 sobre células endoteliales incubadas con el suero de un paciente SHUa. Células HMEC-1 activadas se incubaron con NHS y un suero SHUa portador de una mutación en la región C-terminal de FH, en presencia de PBS (-), sCR1 (control) y FB28.4.2. Las células se tiñeron con un Ab anti-C3c humano hecho en conejo marcado con FITC (Dako) o con un Ab anti-CD59 humano hecho en conejo (Calbiochem) seguido de un secundario marcado con FITC (Jackson Laboratories). El área con fluorescencia de C3 (A) y C5b-9 (B) se calculó mediante un programa de análisis automático de imagen. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes.

1.4.2 El FB28.4.2 inhibe la lisis y opsonización de eritrocitos HPN

Mediante un ensayo de Ham Test (apartado 8.3 Materiales y métodos) analizamos la capacidad del FB28.4.2 para bloquear la lisis de eritrocitos de pacientes HPN. En este ensayo, la incubación con un NHS acidificado promueve la lisis de los eritrocitos HPN (E-HPN) pero no la de los eritrocitos normales. El porcentaje de eritrocitos lisados variará dependiendo del tamaño del clon HPN de cada paciente.

Independientemente de cuál fuera este porcentaje, al realizar el ensayo observamos que la presencia de cantidades crecientes de FB28.4.2 en el NHS acidificado producía una progresiva inhibición de la lisis (Figura 6.A). En todos los casos la inhibición del 100% de la lisis se alcanzó a una concentración de FB28.4.2 que era la mitad de la concentración molar del FB presente en el suero (FB: 900 mM).

Una de las consecuencias que desde hace varios años viene siendo observada en los pacientes tratados con eculizumab es la opsonización de sus eritrocitos con fragmentos procedentes de la activación de C3, lo cual puede desencadenar en hemólisis extravascular (Brodsky, et al., 2008, Hillmen, et al., 2006, Kelly, et al., 2011, Luzzatto, et al., 2011). En este

mismo grupo de pacientes HPN analizamos este depósito de C3 sobre los eritrocitos mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-C3, verificando la presencia de un alto porcentaje de eritrocitos opsonizados con C3. Como el FB28.4.2 había demostrado inhibir la lisis de los E-HPN, quisimos comprobar si también era capaz de inhibir el depósito de fragmentos de C3 sobre la superficie de los eritrocitos. Para ello empleamos eritrocitos de conejo, que como había comentado previamente, eran sensibles a la lisis en presencia de NHS, y los incubamos con el FB28.4.2. Como control positivo, incubamos los eritrocitos con NHS y eculizumab. Al analizar el depósito por citometría observamos, que mientras que en presencia de eculizumab todos los eritrocitos estaban recubiertos de C3, el FB28.4.2 había bloqueado la opsonización de los eritrocitos no encontrando ninguna célula recubierta de fragmentos de C3 (Figura 6.B).

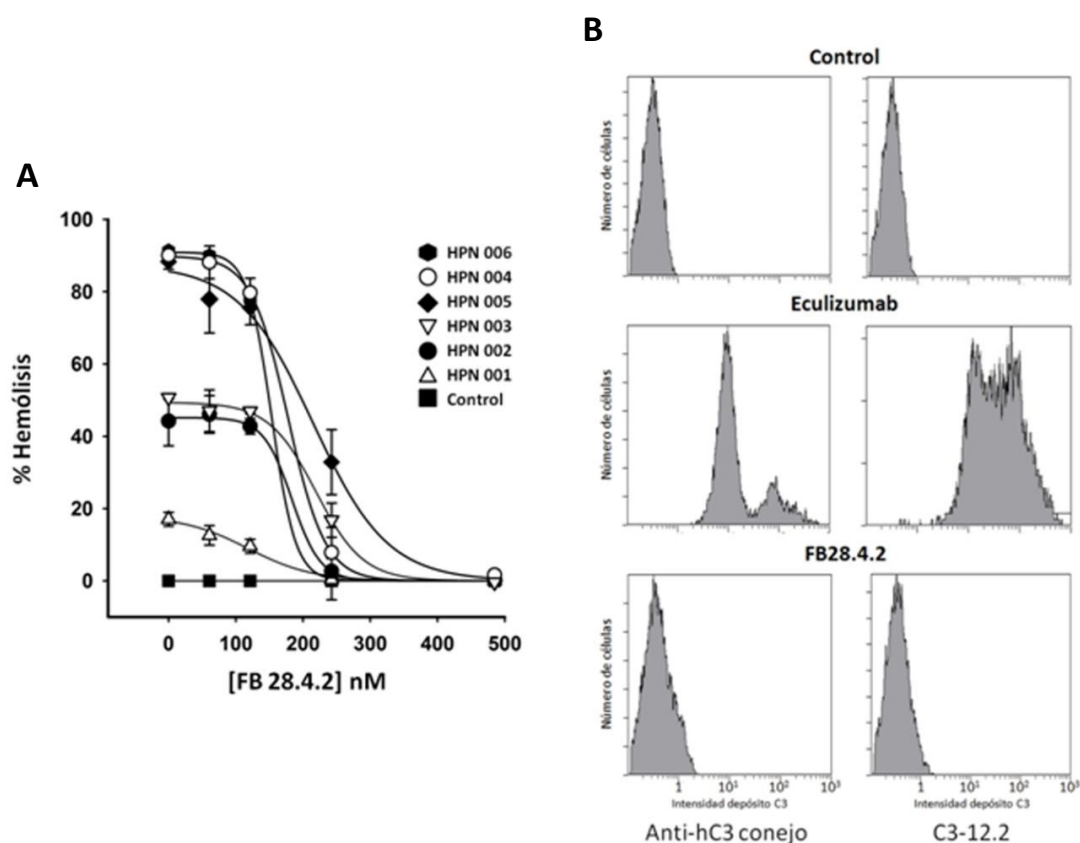


Figura 6. El FB28.4.2 inhibe la lisis y opsonización con C3 de eritrocitos HPN. A) Ensayo de Ham test empleando eritrocitos de 6 pacientes HPN y un individuo control. Los eritrocitos fueron incubados con un NHS acidificado y distintas concentraciones del FB28.4.2 (de 0.06 μ M a 0.5 μ M). Los porcentajes iniciales de hemólisis dependían del tamaño del clon HPN de cada paciente. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. B) Los eritrocitos de conejo fueron incubados con NHS en presencia de un exceso de eculizumab (20 μ g) o de FB28.4.2 (9 μ g) en AP buffer a 37°C. El depósito de C3 sobre los eritrocitos fue determinado mediante citometría de flujo con un Ab policlonal anti-C3 humano hecho en conejo y un mAb anti-iC3b/C3dg (C3-12.2, producido en el laboratorio). Como control se incubaron los eritrocitos con NHS y EDTA. El experimento se realizó por duplicado obteniendo idénticos resultados.

1.4.4 El FB28.4.2 previene la aparición de la enfermedad en un modelo in vivo de EAMG

Verificada la efectividad del uso del FB28.4.2 en varios modelos in vitro de enfermedades de complemento asociadas principalmente con una desregulación de la vía alternativa, decidimos analizar la capacidad de inhibición del FB28.4.2 en un modelo in vivo en el que la activación de la vía clásica fuera el desencadenante de la enfermedad. Como se ha mostrado en los experimentos anteriores (apartado 1.1.4 y 1.2.1 de Resultados), el ratón no parecía el animal adecuado para realizar estos ensayos, de manera que elegimos la rata en cuyo suero había demostrado tener capacidad inhibitoria. Para realizar este modelo se estableció una colaboración con Paul Morgan (Cardiff University) que tenía puesto a punto un modelo de Miastenia Gravis Experimental Autoinmune (EAMG) en rata. Cabe destacar, que a pesar de la baja afinidad del FB28.4.2 por el FB de ratón, en el laboratorio hemos conseguido purificar eficazmente el FB del suero de ratón mediante una columna afinidad de sepharosa acoplada al mAb FB28.4.2 (resultados no mostrados).

La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune asociada a la presencia de autoanticuerpos frente al receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) localizado en las placas motoras. Estos anticuerpos inducen la enfermedad mediante varios mecanismos; por un lado, su unión a los receptores bloquea el acceso al ligando y promueve su internalización por endocitosis y su posterior degradación, reduciendo así el número de AChR activos en la superficie (De Baets and Stassen, 2002, Hughes, et al., 2004). Además, este depósito masivo de IgGs activa la vía clásica del complemento, lo que desencadena en la lisis y destrucción de la membrana de las placas motoras (Tuzun and Christadoss, 2013). En el individuo, esto se traduce en debilidad muscular y fatiga, principalmente en los músculos que son usados de forma frecuente y repetitiva como los de los ojos. Varios estudios han mostrado que la lisis mediada por complemento parece ejercer un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, varios inhibidores de complemento como el sCR1 o el anti-C1 han atenuado significativamente la debilidad muscular en ratas (Piddlesden, et al., 1996) (Huda, et al., 2014, Tuzun, et al., 2007).

Pese a que el FB28.4.2 era un inhibidor de la vía alternativa y la enfermedad se iniciaba por vía clásica, la activación del complemento requiere siempre del loop de amplificación de la vía alternativa, por lo que cabría esperar, que al inhibir esta amplificación se frenara la destrucción de las placas motoras y se mitigaran los síntomas de la enfermedad. La miastenia gravis experimental autoinmune (MGEA), es el modelo animal de esta enfermedad, y puede

inducirse de forma activa mediante la inmunización con AChR, o de forma pasiva mediante la transfusión de Ab anti AChR. Para nuestro modelo se usó la inmunización pasiva mediante la administración del anti-AChR mAb35.

Al inicio del experimento se establecieron dos grupos de animales, un grupo control y otro grupo de estudio, formado por 6 ratas cada uno. Al grupo de estudio se le inyectó una única dosis por vía intravenosa de 8 mg de FB28.4.2, mientras que al grupo control se le inyectó PBS. Estas inyecciones coincidieron en el tiempo con la inducción de la enfermedad. Como se puede observar en la Figura 8, pasadas 24h desde la inducción de la enfermedad, las ratas del grupo control presentaban de media una pérdida de peso del 10% (Figura 8.A) y un nivel medio de parálisis de 2.5 (evaluado del 0 al 4)(Figura 8.B). De hecho, en este punto, dos ratas tuvieron que ser sacrificadas debido a que su nivel de parálisis superó el grado 3. Sin embargo, en el grupo de estudio tratado con el FB28.4.2, las ratas no habían sufrido pérdida de peso y ninguna presentaba síntomas de parálisis. A las 48h, las ratas del grupo control continuaban perdiendo peso, y todas habían superado el grado 3 de parálisis mientras que las del grupo de estudio, mantenían su peso y apenas se habían detectado signos de parálisis, con una media de 0.8.

Para analizar si el complemento estaba inhibido, la actividad hemolítica del suero fue medida a diferentes tiempos durante el ensayo. A las 4h de la inducción, el suero de las ratas tratadas con FB28.4.2 presentaba una reducción de la actividad hemolítica del 90% con respecto al grupo control, a las 24h era del 60% y del 35% a las 48h (Figura 8.C).

Para estudiar de forma más directa el impacto que tenía la inhibición del complemento por el FB28.4.2 en el desarrollo de la enfermedad, se contaron el número de uniones neuromusculares intactas encontradas en secciones de músculo sóleo. Observamos, que la media de uniones neuromusculares activas para 5 campos de visión de las ratas control era de 1.6, mientras que la de las ratas tratadas con FB28.4.2 era de 10.6 (Figura 8.D).

En conjunto, estos resultados ponían en evidencia la eficacia del FB28.4.2 en el bloqueo de la lisis mediada por complemento en las placas motoras, lo que se manifestaba en una reducción significativa en la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad de miastenia gravis.

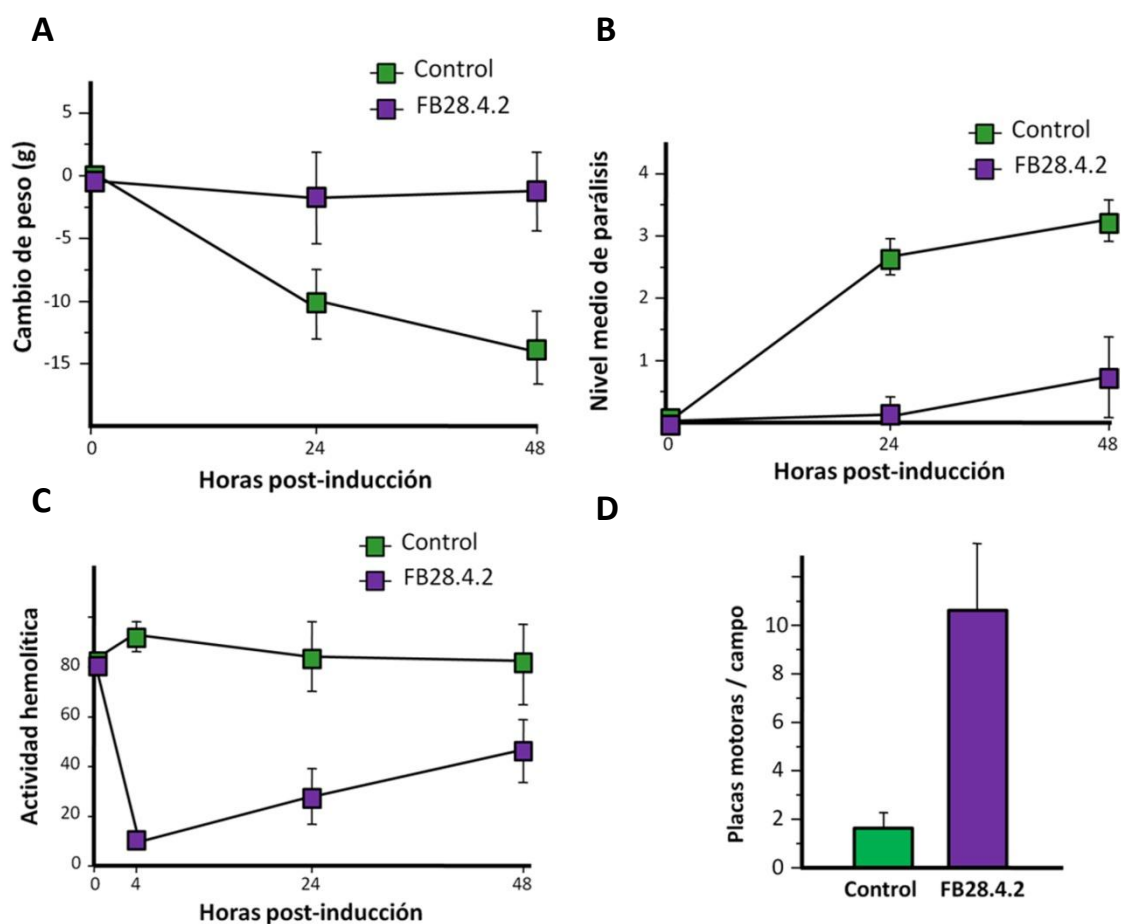


Figura 9. El mAb FB28.4.2 previene el desarrollo de EAMG en ratas. Tras la inducción de MGEA mediante la administración de Ab anti-AChR (tiempo 0), se monitorizó el peso (A), el nivel medio de parálisis (B) y la actividad hemolítica (C) tanto del grupo control, inyectado con PBS, como del grupo tratado con FB28.4.2. a las 4, 24 y 48h posteriores a la inducción. Los resultados representan la media \pm DE de 6 ratas de cada uno de los grupos. Clasificación del nivel de parálisis: 0, puede agarrarse y levantar la tapa de la jaula; 1, puede agarrarse pero no levantar la tapa; 2, no puede agarrarse; 3, no puede agarrarse y tiene las extremidades traseras paralizadas; 4, moribundo. D) Media del conteo de uniones musculares (placas motoras) de secciones de músculo sóleo de 5 campos de visión a una magnificación de 20X teñidas con bungarotoxina α marcada con rodamina.

2. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a C3

2.1 Purificación de antígenos: C3b, iC3b, C3dg

Tanto C3 como los fragmentos derivados de su activación se generaron y purificaron en el laboratorio (apartado 1.1 y 1.4 de Materiales y métodos).

2.2 Generación y selección de mAbs anti-C3

Siguiendo el mismo esquema descrito para la generación de anticuerpos anti-FB, en el laboratorio de Mercedes Domínguez se generaron los anticuerpos anti-C3 mediante la inmunización de ratones C57Bl/6 deficientes en C3 con una mezcla de fragmentos de la activación de C3 (C3b, iC3b y C3dg), y se enviaron al laboratorio 15 hibridomas que mostraban reactividad frente a C3.

Los anticuerpos se caracterizaron mediante ELISA, Western blot y ensayos funcionales y se seleccionaron en función de su capacidad para inhibir la activación del complemento y su reactividad frente a epítopos relevantes en C3. Siguiendo este criterio se seleccionaron cuatro mAbs; tres de ellos, el C3-16.4, el C3-12.17 y el C3-42.3 bloqueaban la lisis de los eritrocitos de conejo en un ensayo hemolítico y el mAb C3-12.2 reconocía específicamente los fragmentos iC3b y C3dg. De todos ellos se profundizó en su caracterización funcional y estructural.

2.3 Caracterización mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4

2.3.1 Caracterización bioquímica

Los anticuerpos C3-16.4, C3-12.17 y C3-42.3 reconocían en ELISA los fragmentos C3b, iC3b y C3c humanos (Figura 10.A). En WB sólo el C3-12.17 mostraba reactividad frente a C3 reconociendo la cadena beta. (Figura 10.B). Además, el anticuerpo C3-16.4 también era capaz de reconocer el C3 de ratón en ELISA (Figura 10.A).

La constante de afinidad (KD) de los anticuerpos hacia C3b humano se determinó mediante RPS. En todos los casos la KD estaba dentro del rango nM, mostrando por tanto una gran afinidad hacia este fragmento (C3-12.17 KD: 63 nM, C3-42.3 KD: 0.73 nM y C3-16.4 KD: 1.2 nM). También se determinó la KD del C3-16.4 hacia el C3 de ratón, siendo ésta de un orden de magnitud menor que la que presentaba hacia el C3b humano (KD: 0.68 nM). Tal y como se observa en la Figura 11, estas diferencias se deben a que la constante de disociación (Kd) del C3-16.4 hacia el C3 de ratón es mucho mayor que hacia el C3 humano.

Todos los resultados de la caracterización bioquímica se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen caracterización mAbs anti-C3.

mAbs	Isotipo	Fragmentos que reconoce	Dominios que reconoce	KD(M)	Ka ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Kd(s^{-1})
C3-16.4	IgG1	C3b, iC3b, C3c	MG2, MG6	1.2 nM	$3.7 \cdot 10^{+4}$	$4.4 \cdot 10^{-5}$
C3-12.17	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG3, MG4	63 nM	$7.8 \cdot 10^{+4}$	$5 \cdot 10^{-5}$
C3-42.3	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG4, MG5	0.73 nM	-	-

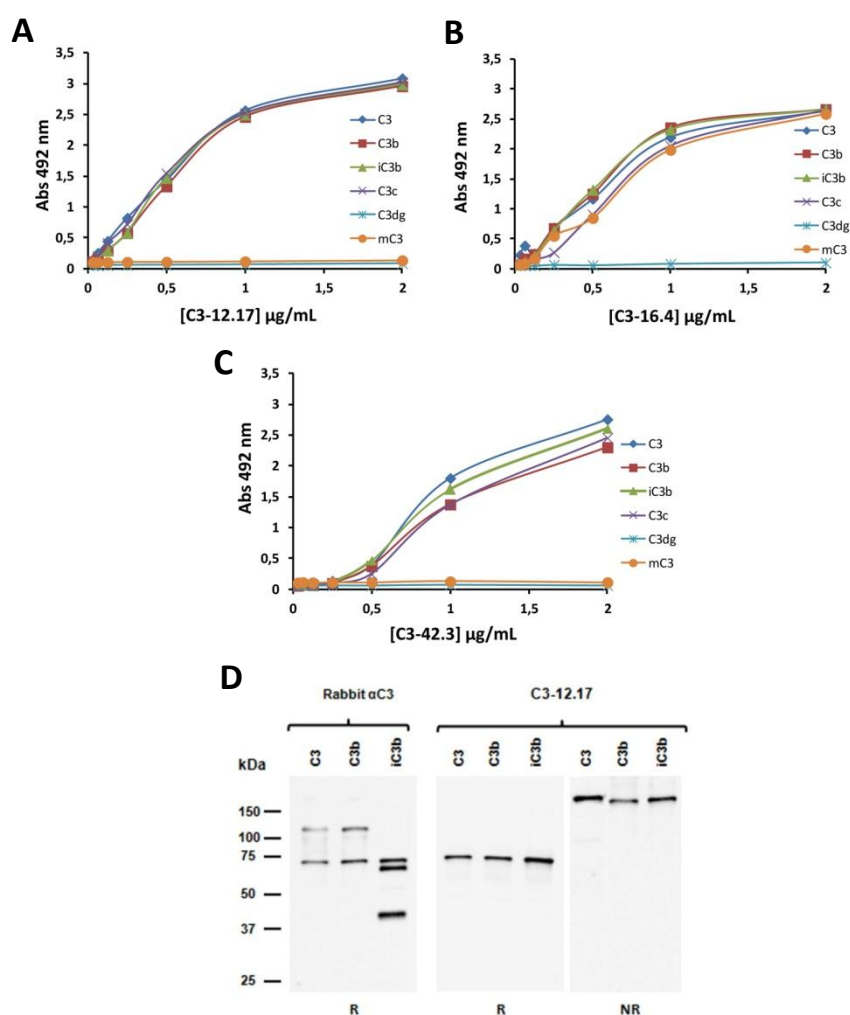
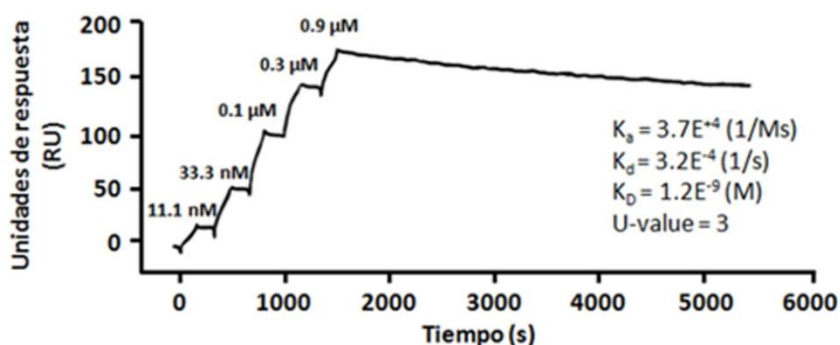


Figura 10. Reactividad de los anticuerpos frente a los fragmentos de C3. ELISA sembrado con las proteínas purificadas C3, C3b, C3c, iC3b, C3dg (1 μg) para mostrar la reactividad de los mAbs C3-12.17 (A), C3-16.4 (B) y C3-42.3 (C). WB con proteínas purificadas C3, C3b iC3b (100ng) en condiciones de reducción (R) y no reducción (NR) con el mAb C3-12.17 (0.5 $\mu\text{g/mL}$). Se incluyó un Ab policlonal anti-C3 hecho en conejo como control positivo para observar el patrón de bandas de los fragmentos de C3.

A



B

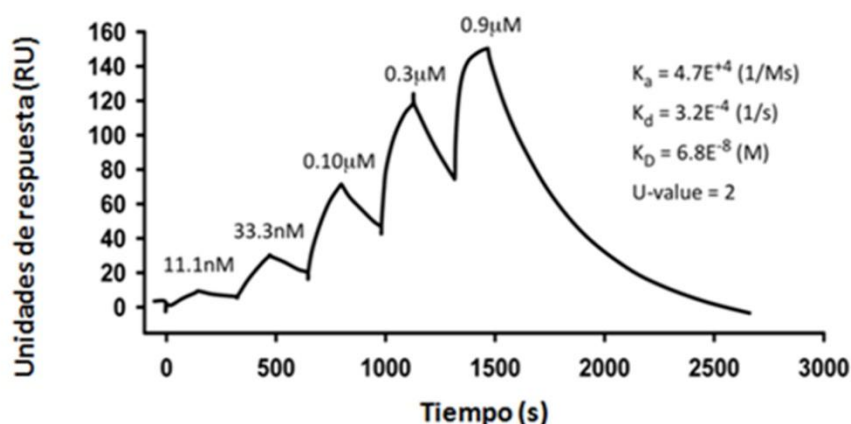


Figura 11. El C3-16.4 reconoce con alta afinidad el C3b humano. A) Sensograma representativo de un ensayo syngle-cycle kinetics para calcular la afinidad entre el C3b humano y el C3-16.4. En un chip CM5 se inmovilizaron 100 RUs del C3-16.4 usando el kit de captura de IgG de ratón y se fluyeron 5 concentraciones consecutivas crecientes del C3b humano (11.1 nM a 0.9 μ M). B) Sensograma representativo de un ensayo syngle-cycle kinetics para calcular la afinidad entre el C3 de ratón y el C3-16.4. Los ensayos fueron realizados por duplicado obteniendo idénticos resultados.

2.3.2 Caracterización funcional

Los tres mAbs eran capaces de bloquear la lisis mediada por complemento en un ensayo AP50 con eritrocitos de conejo, y lo hacían a una concentración equimolar con el C3 presente en la reacción ([C3]:0.39 μ M; [mAb anti-C3]:0.3 μ M) (Figura 12.A). Además, mediante citometría de flujo confirmamos que los anticuerpos no sólo eran capaces de inhibir la lisis de los eritrocitos de conejo si no también su opsonización con C3 (Figura 12.B). Para conocer el mecanismo por el cual lo hacían, realizamos un ensayo in vitro de activación de C3 usando proteínas purificadas, y los fragmentos resultantes se analizaron en un gel de SDS-PAGE teñido

con coomassie. Como se muestra en la Figura 13, los tres anticuerpos inhibían la activación de C3, pero parecían hacerlo por mecanismos diferentes.

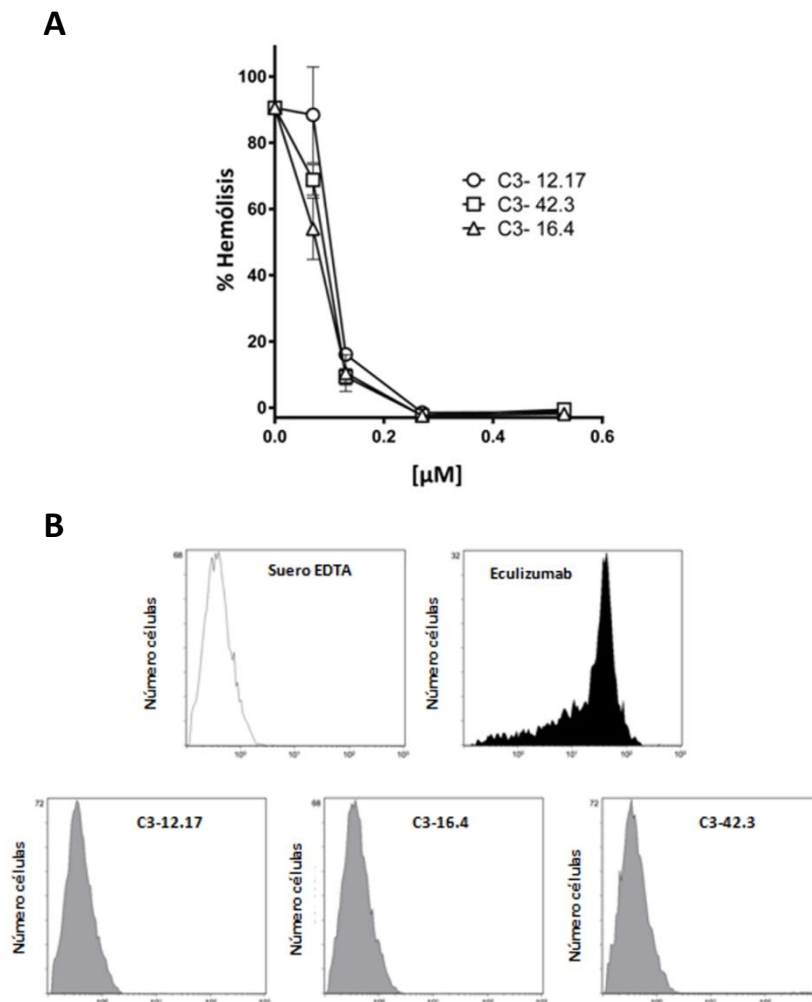


Figura 12. Los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 inhiben la lisis y la opsonización con C3 de eritrocitos de conejo. A) Ensayo hemolítico con eritrocitos de conejo (AP50) en presencia de NHS para analizar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la lisis mediada por complemento. Los resultados representan la media \pm DE de triplicados de un experimento representativo de tres. B) Los eritrocitos de conejo fueron incubados en presencia de NHS y exceso de los mAbs C3-12.17, C3-42.3, C3-16.4 y eculizumab (control positivo). Como control negativo empleamos NHS 20mM EDTA. El depósito de C3 en los eritrocitos fue analizado por citometría de flujo con un Ab policlonal anti-C3. El ensayo se realizó por triplicado obteniendo idénticos resultados. Los datos representados son el ejemplo de uno de los ensayos.

Los anticuerpos C3-12.17 y C3-42.3 bloqueaban la activación de C3 a C3b, pero el FB se consumía completamente generando los fragmentos Bb y Ba. Esto nos estaba indicando que la unión de los anticuerpos a C3 no interfería en la formación de la AP C3-convertasa, el C3b/C3H₂O podía unirse a FB y éste cortarse por FD consumiéndose por completo. Estos datos sugerían que los anticuerpos actuaban o bien bloqueando la interacción entre AP C3-convertasa y su sustrato, C3, o bloqueando el acceso de C3 al sitio catalítico de la AP C3-convertasa. El anticuerpo C3-16.4, por otro lado, bloqueaba tanto el corte de C3 como el de FB. En este caso, el C3-16.4 actuaba impidiendo la interacción entre el C3b/C3H₂O y el FB, inhibiendo así la formación de la AP C3-convertasa.

Como el C3-16.4 también reconocía el C3 de ratón, realizamos un ensayo hemolítico empleando suero de ratón para ver si era capaz de inhibir la lisis de los eritrocitos de conejo (Figura 14). Observamos que al aumentar la concentración de C3-16.4 en el suero conseguíamos disminuir progresivamente la lisis hasta alcanzar una inhibición del 100% ([C3]: 0.3 μ M; [C3-16.4]: 0.46 μ M).

En conjunto estos datos mostraban que disponíamos de dos mAbs, el C3-12.17 y el C3-42.3 que inhibían la activación del complemento al bloquear la activación de C3 y otro mAb, el C3-16.4, que lo hacía al inhibir la formación de la AP C3-convertasa tanto en humanos como en ratón.

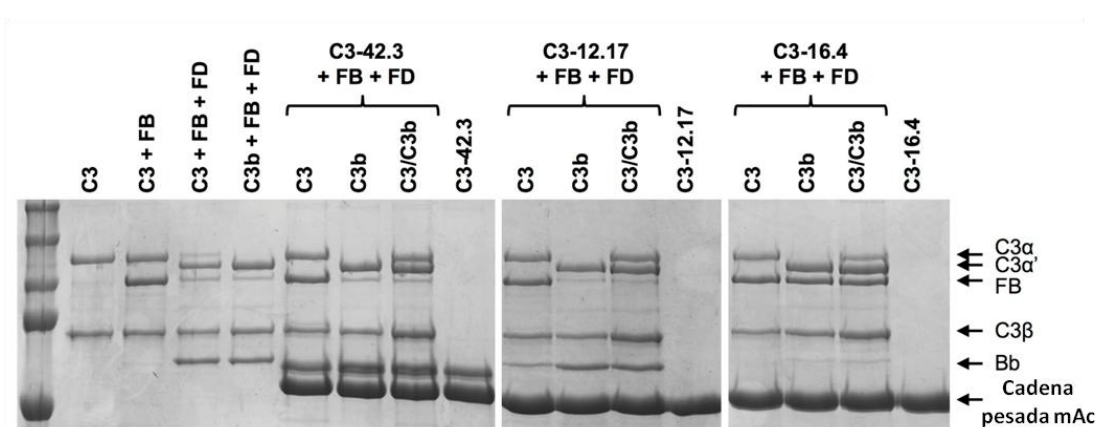


Figura 13. Los mAbs C3-42.3, C3-12.17 y C3-16.4 bloquean la activación de C3. Los diferentes mAb fueron pre-incubados con las proteínas purificadas C3, C3b o una mezcla de ambas. Posteriormente se añadió FB y FD y se analizó el corte de las bandas de C3 y FB en un gel SDS-PAGE en condiciones de reducción teñido con azul coomassie. A la izda del gel se muestran los carriles control con las bandas correspondientes de cada una de las proteínas.

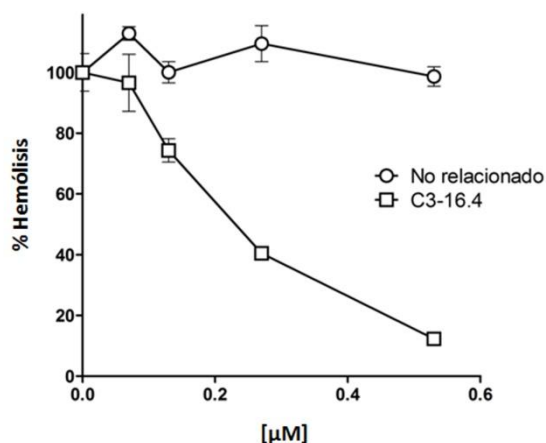


Figura 14. El mAb C3-16.4 inhibe la lisis de eritrocitos de conejo incubados con suero de ratón. Ensayo AP50 en el que eritrocitos de conejo fueron incubados con un 20% de suero de ratón y concentraciones crecientes del C3-16.4. Como control del ensayo se empleó un mAb no relacionado (anti-laforina). Las muestras se incubaron por triplicado y el ensayo se replicó tres veces obteniendo idénticos resultados. Los datos representados son el ejemplo de uno de los ensayos.

2.3.3 Caracterización estructural.

Para poder conocer los mecanismos moleculares detrás de esta inhibición de la AP se analizó por microscopía electrónica el sitio de interacción de los fragmentos Fab de estos anticuerpos con la molécula de C3b. Este estudio se hizo en colaboración con el laboratorio del Prof. Óscar Llorca (CIB, Madrid). Se prepararon muestras de cada complejo C3b-Fab para ME y se sometieron a análisis mediante procesamiento de imagen. Esto permitió obtener modelos tridimensionales de baja resolución de cada uno de los complejos.

Aunque los anticuerpos C3-12.17 y C3-42.3 en los ensayos funcionales habían mostrado ejercer su inhibición de la activación de complemento actuando al mismo nivel, las estructuras en 3D determinaron que cada uno reconocía un epítipo diferente dentro del anillo de macroglobulinas (MG). El C3-42.3 interaccionaba con una región en C3b que se correspondía con los dominios MG4 y MG5 (Figura 15.A) mientras que el C3-12.17 se unía a una región correspondiente a los dominios MG3 y MG4 (Figura 15.B). Del análisis de la interacción del Fab del C3-12.17 con iC3b se obtuvieron los mismos resultados observados en el complejo del C3-12.17 -C3b (Figura 15.C).

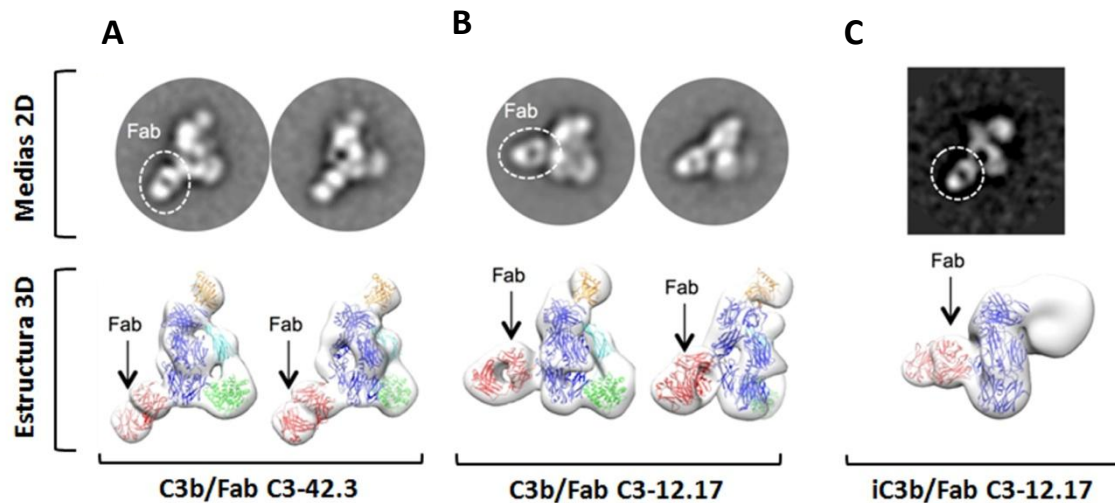


Figura 15. Estructura del complejo formado por C3b/iC3b y los Fab C3-12.17 y C3-42.3. Las medias 2D representativas se obtuvieron a partir de la media de cientos de imágenes de los complejos C3b con Fab C3-42.3 (A), Fab C3-12.17 (B) e iC3b con Fab C3-12.17 (C). Cada uno de los Fab se señala mediante un círculo discontinuo (parte de arriba del panel). Las estructuras en 3D fueron interpretadas gracias a el ajuste con la estructura cristalográfica del C3b (PDB 2I07) (Janssen, et al., 2006) y una estructura respresentativa de un Fab (parte de abajo del panel). El anillo de MG se representa en azul, el domino C345c en naranja, el TED en verde y el Fab en rojo.

Los dominios del MG1 al MG6 se estructuran formando el anillo de MGs que conforma la cadena β de C3. Esta cadena está presente tanto en C3 como en los fragmentos C3b, iC3b y C3c pero no en C3dg. Por tanto, los datos obtenidos por ME explicarían porque estos anticuerpos son capaces de reconocer en ELISA estos fragmentos y no el C3dg. Además, concuerdan con los resultados obtenidos por WB del C3-12.17, en los que éste anticuerpo reconocía la cadena β de C3.

La estructura en 3D del complejo formado por C3b y el Fab del C3-16.4, que a diferencia del C3-12.17 y C3-42.3 inhibe la formación de la AP C3-convertasa, mostró que el C3-16.4 reconocía una región entre el MG2 y el MG6 (Figura 16).

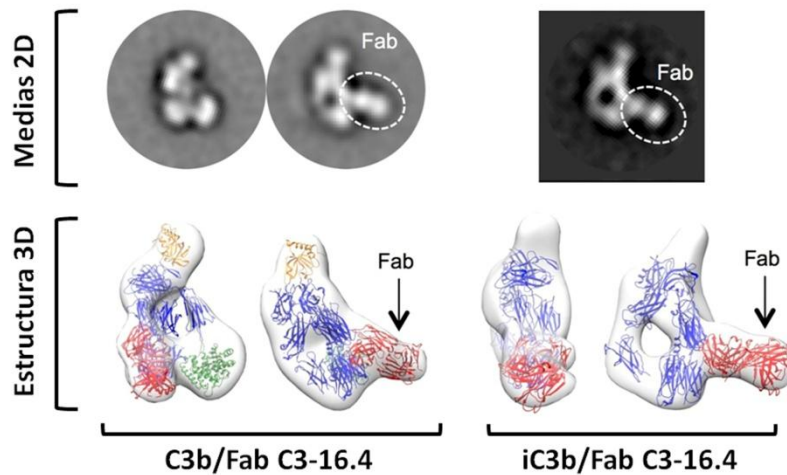


Figura 16. Estructura del complejo formado por C3b/iC3b y el Fab C3-16.4. Las medias 2D representativas se obtuvieron a partir de la media de cientos de imágenes de los complejos C3b con Fab C3-16.4. El Fab se señala mediante un círculo discontinuo. Las estructuras en 3D fueron interpretadas gracias a el ajuste con la estructura cristalográfica del C3b (PDB 2107) (Janssen, et al., 2006) y una estructura representativa de un Fab. El código de color es el mismo que el de la Figura 16.

El C3-16.4 reconoce una región en C3b cercana, pero que no se solapa exactamente con los dominios de interacción con FB (Forneris, et al., 2010), de manera que es posible que el C3-16.4 inhiba la formación de la AP C3-convertasa de manera indirecta como consecuencia de que la unión del anticuerpo provoque un cambio conformacional en C3b.

Para demostrar si el mecanismo de inhibición por parte del C3-16.4 se mantenía en el Fab, o si por el contrario, era únicamente consecuencia del impedimento estérico causado por la masa del anticuerpo completo, repetimos los ensayos de funcionalidad empleando su fragmento Fab. En el ensayo hemolítico observamos que el Fab del C3-16.4 también era capaz de inhibir la lisis de los eritrocitos de conejo (Figura 17.A). Las diferencias encontradas en la curva de inhibición entre el anticuerpo completo y el Fab probablemente sean debidas a los efectos de la avidéz. Usando proteínas purificadas volvimos a replicar los resultados obtenidos con el anticuerpo C3-16.4 completo en el ensayo de activación de C3 (Figura 17.B), descartando por tanto que sea el tamaño del C3-16.4 lo que impide la unión entre C3b y FB.

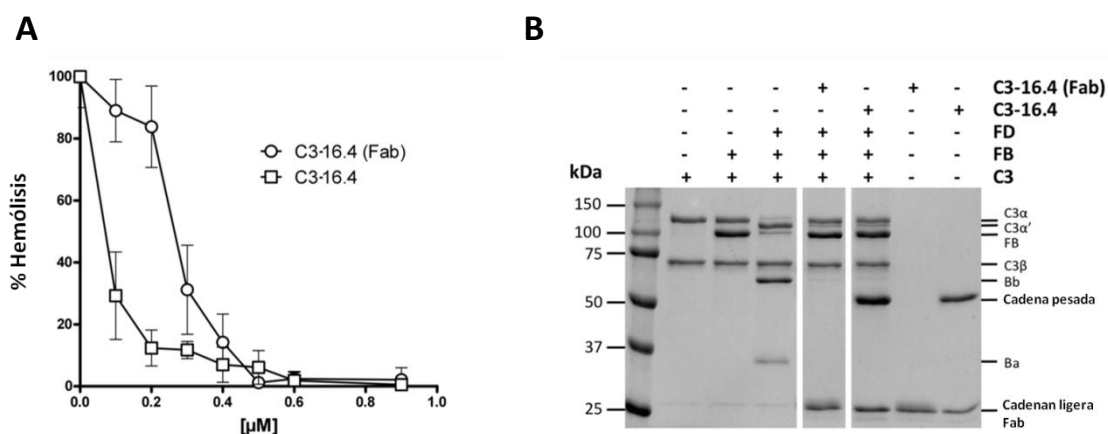


Figura 17. El Fab C3-16.4 inhibe la formación de la AP C3-convertasa y la lisis mediada por complemento de eritrocitos de conejo. A) Los eritrocitos de conejo se incubaron en presencia de NHS y concentraciones crecientes del mAb C3-16.4 o su Fab. Los datos representan la media \pm DE de triplicados de un experimento representativo de tres con idénticos resultados. B) Gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie de un ensayo de activación de C3 en presencia del mAb C3-16.4 o su Fab.

2.4 Aplicación de los anticuerpos en modelos de enfermedad asociados a desregulación de complemento

2.4.1 Modelo in vitro de aHUS

Como se ha descrito en el apartado 1.1.3 de resultados, en el laboratorio tenemos puesto a punto un modelo in vitro para valorar la deficiencia en FH de un suero humano empleando eritrocitos de carnero. Para simular un suero con SHUa, hemos deplecionado un suero normal del 75% de su FH. Empleando este suero, en el ensayo hemolítico alcanzamos una lisis de alrededor de un 70%. Para valorar la capacidad de los tres mAbs anti-C3 en revertir la lisis derivada de este defecto en la regulación del complemento, añadimos a este suero concentraciones crecientes de cada uno de los tres anticuerpos (C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4). Conseguimos reducir progresivamente la lisis hasta alcanzar una inhibición del 100% en condiciones equimolares con el C3 del suero ([mAbs]: 0.7 μ M; [C3 suero]: 0.83 μ M)(Figura 18).

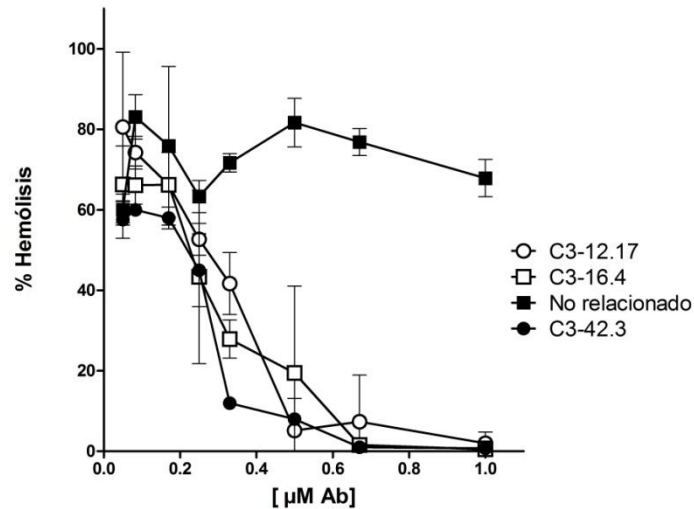


Figura 18. Los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 inhiben la lisis mediada por complemento de los eritrocitos de carnero en un modelo in vitro de SHUa. Los eritrocitos de carnero fueron incubados en presencia de un suero tipo-SHUa (deplecionado del 75% de FH) y de concentraciones crecientes de los diferentes mAbs anti-C3 (desde 0.05 a 1 μM). Como control se empleó un mAb no relacionado con complemento (anti-laforina). Los datos representan la media \pm DE de triplicados de un experimento representativo de tres diferentes con similares resultados.

2.4.2 Modelo in vitro de HPN

Para realizar este ensayo empleamos el test de Ham utilizando los eritrocitos de un paciente HPN que por citometría habíamos visto que tenía un alto depósito de C3 sobre la superficie de sus eritrocitos. Estos eritrocitos se incubaron en presencia de un suero normal acidificado y distintas concentraciones de los tres anticuerpos. Con este ensayo demostramos que los anticuerpos C3-12.17 y C3-42.3 bloqueaban de manera muy eficiente la lisis de los eritrocitos HPN, consiguiendo una inhibición total de la lisis a concentraciones equimolares con el C3 presente en el suero ([mAbs]: 0.92 μM ; [C3 suero]: 0.92 μM) (Figura 19). Sin embargo, sorprendentemente, el C3-16.4 no era capaz de proteger a los eritrocitos de la lisis. Una posible explicación a este resultado podía ser que el anticuerpo no fuera capaz de bloquear la formación de la AP C3-convertasa cuando el C3b estuviera depositado en la superficie.

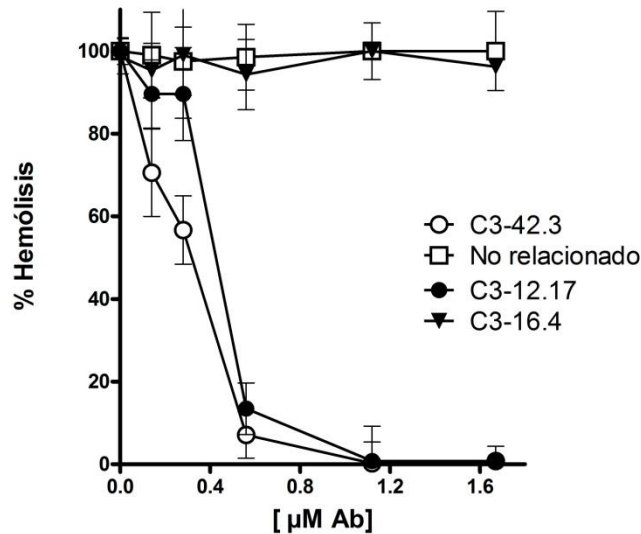


Figura 19. Los mAbs C3-12.17 y C3-42.3 previenen la lisis mediada por complemento de eritrocitos HPN en presencia de suero acidificado. Ensayo de Ham test empleando eritrocitos de un paciente HPN en presencia de 50% de NHS y concentraciones crecientes de los mAbs anti-C3. Como control se empleó un mAb no relacionado. Los datos representan la media \pm DE de triplicados de un experimento representativo de tres diferentes con similares resultados.

Para confirmar esta hipótesis, realizamos otro ensayo hemolítico empleando eritrocitos de conejo que estuvieran recubiertos de fragmentos activos de C3. Para recubrir estos eritrocitos con C3 los incubamos en presencia de suero y eculizumab, ensayo con el que ya habíamos comprobado previamente por citometría que generaba unos eritrocitos altamente opsonizados con fragmentos de C3 (Figura 12). Los resultados obtenidos de la incubación de estos eritrocitos con un suero normal en presencia de los anticuerpos fueron los mismos que los observados con el ensayo con eritrocitos HPN. El anticuerpo C3-16.4 no inhibía la lisis de los eritrocitos de conejo a diferencia del C3-12.17 y C3-42.3 que sí lo hacían (Resultados no mostrados). Estos datos confirmaban la idea de que el anticuerpo C3-16.4 no era capaz de ejercer su función inhibitoria cuando el C3b estaba depositado sobre las superficies celulares.

2.4.3 Modelo in vitro de Glomerulopatía C3 asociada a C3Nef

Las glomerulopatías C3 (C3G) son un tipo de glomerulonefritis membranoproliferativas que describen a un grupo de enfermedades renales caracterizadas por el depósito masivo de C3 en el glomérulo renal en ausencia de IgGs. Se clasifican dos grupos principales, las enfermedades por depósito denso (DDD) en la que el depósito se localiza en la membrana basal glomerular y las glomerulonefritis C3 (C3GN) que son el resto de C3G. Clínicamente se

manifiestan en los pacientes con proteinuria, hematuria y fallo renal (Cook and Pickering, 2015). La causa del desarrollo de C3G es la desregulación de la vía alternativa, ya sea por causas genéticas o adquiridas. La desregulación en este caso, a diferencia de SHUa, conduce a un consumo de C3, y los fragmentos derivados de esta activación se depositan en el riñón. Dentro de las causas genéticas, la mayoría de los casos se deben a reordenamientos en los genes de los CFHR (Medjeral-Thomas, et al., 2014, Tortajada, et al., 2013) y mutaciones en de FH (Servais, et al., 2012) o de ganancia de función en C3 (Martinez-Barricarte, et al., 2010, Xiao, et al., 2014). Sin embargo, alrededor de un 80% de los casos de DDD y un 50% de los casos de C3GN se deben a la presencia de autoanticuerpos frente a la AP C3-convertasa denominados factores nefríticos de C3 (C3Nefs). Estos C3Nefs actúan protegiendo a la C3-convertasa de la regulación por FH, haciéndola por tanto más estable y prolongando su vida media, consumiéndose así el C3 en fase fluida.

En el laboratorio nos planteamos si los mAbs serían capaces de bloquear la activación de C3 en presencia de C3Nefs. Cuando un NHS diluido en AP buffer se incubaba a 37°C en presencia de las IgGs de un paciente con un alto título de C3Nefs, el C3 del suero se consume por completo. Las C3-convertasas estabilizadas por los C3Nefs activan todo el C3 a C3b. La cadena α' de C3b será posteriormente procesada por FH generando las cadenas α_{65} y α_{40} de iC3b. Si este mismo suero se incubaba en presencia de IgGs de un individuo normal (IgG N), esta activación de C3 no ocurre (Figura 20). Siguiendo estas mismas condiciones, el NHS con C3Nefs se incubó en presencia de los tres mAbs, C3-16.4, C3-42.3 y C3-12.17, de un mAb control no relacionado (mAb NR) y de EDTA. Como se observa en la Figura 21, los tres mAbs bloqueaban la activación de complemento inhibiendo el corte de la cadena α de C3. En el caso del mAb C3-42.3, se observa una menor inhibición debido probablemente a que no usamos suficiente cantidad de mAb. Tanto en el caso del NHS incubado con AP buffer como con las IgGs de un individuo control (IgG N) se aprecia una ligera activación causada por la presencia de C3(H₂O) en el NHS.

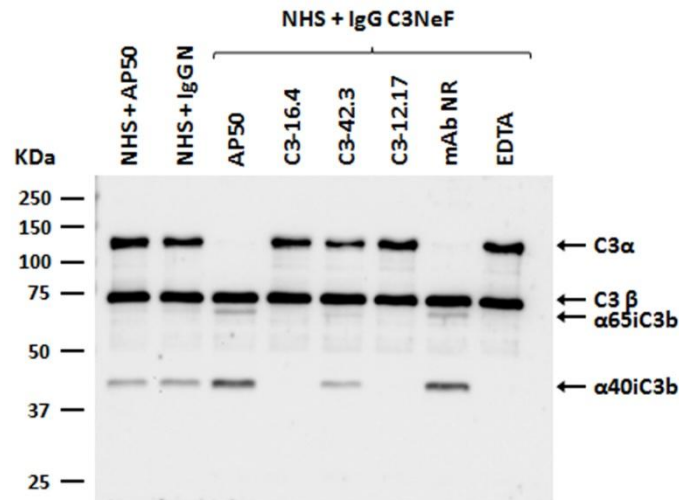


Figura 20. Los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 inhiben la activación de C3 de un NHS en presencia de C3NeFs. WB en condiciones de reducción revelado con un Ab policlonal anti-C3 hecho en conejo (generado en el laboratorio). Un NHS se incubó a 37°C en presencia de IgGs de un paciente con C3NeFs y de los mAbs anti-C3 o de un mAb no relacionado (mAb NR). Como control negativo se empleó un NHS incubado con IgGs purificadas de un individuo normal (IgG N) y un NHS incubado con IgG C3NeFs en presencia de EDTA.

2.5 Caracterización mAb C3-12.2

El C3-12.2 era el único anticuerpo que en los ELISAs de caracterización iniciales no había reconocido el C3 ni el C3b, sólo había detectado las formas iC3b y C3dg. El análisis por WB reveló que el C3-12.2 reconocía la cadena α 65 de iC3b (Figura 21.A), así como los fragmentos derivados de los sucesivos cortes proteolíticos de esta cadena, es decir, C3dg y C3d (Figura 21.B), mostrando que en ningún caso se unía a la región C3c. El hecho de que el anticuerpo estuviera reconociendo el fragmento C3d, limitaba la zona de reconocimiento del anticuerpo a la región C-terminal de C3d, que sólo se expone tras el corte de C3b a iC3b por FI. Confirmamos estos resultados con las imágenes de ME de los complejos formados por el iC3b-Fab C3-12.2 (Figura 21.C) y por el C3d-Fab C3-12.2 (Figura 21.D), que mostraban que la unión del anticuerpo con C3 se producía a través del dominio TED. La afinidad del C3-12.2 hacia iC3b determinada por RPS era de KD: 95 nM, indicando una alta afinidad hacia este ligando. El C3-12.2 no sólo reconocía el C3dg en humanos, sino también en los sueros activados de otras especies como ratón y rata (Figura 21.E).

En la línea de estos resultados, pensamos que la interacción del C3-12.2 con el dominio TED quizás impediría el procesamiento del iC3b a C3dg por CR1 y FI. Al incubar estas proteínas purificadas en presencia del mAb y analizarlas en un gel de SDS-PAGE teñido con coomassie,

observamos que sí se producía el corte de iC3b a C3dg, de manera que el anticuerpo no interfería en la unión de iC3b con CR1 (Figura 21.F).

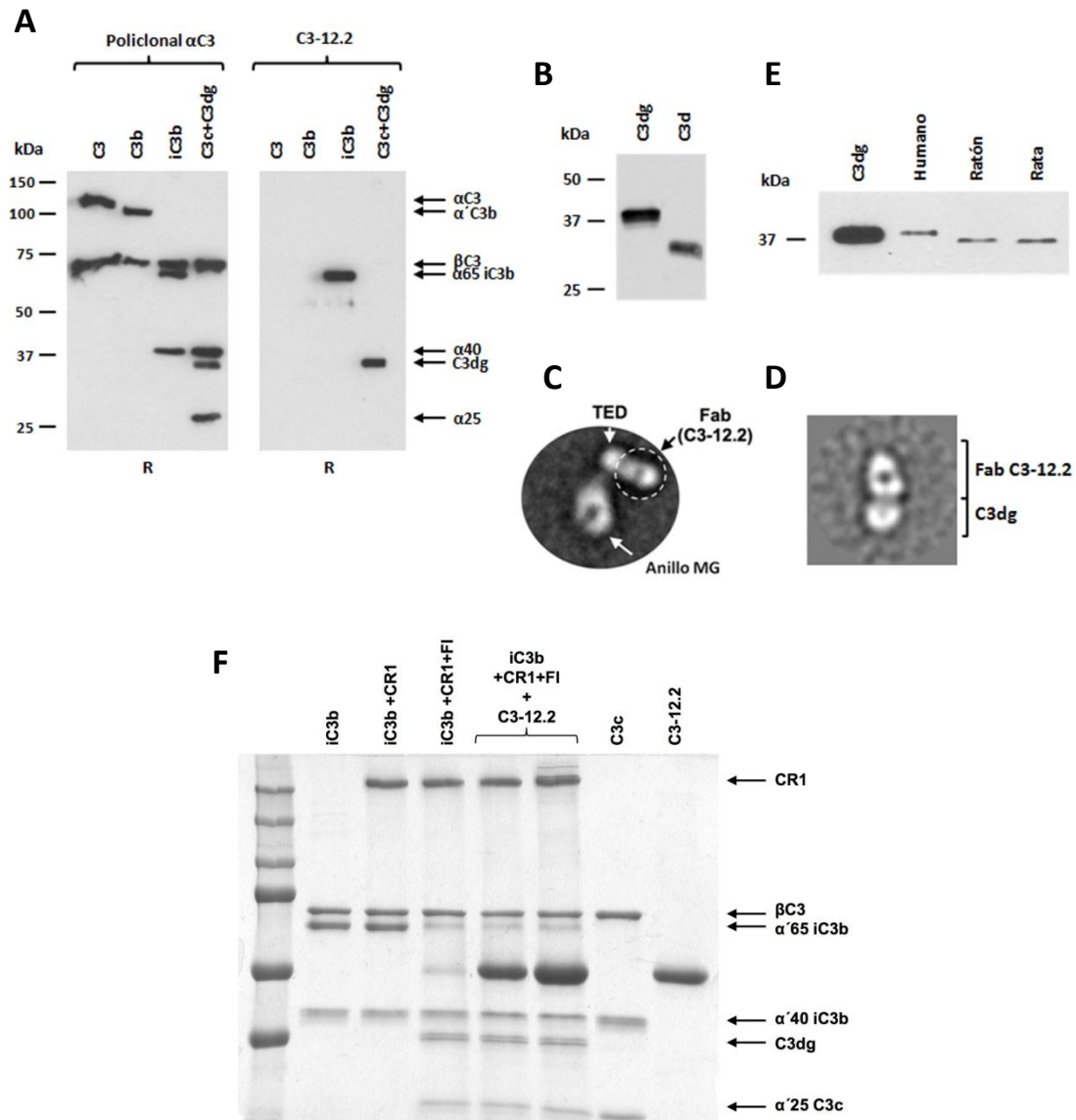


Figura 21. El C3-12.2 reconoce un neopéptido en C3d que se expone tras el corte de C3b a iC3b. A y B) WB en condiciones reducidas (R) empleando proteínas purificadas. Como control para mostrar el patrón de bandas de C3 se empleó un Ab policlonal anti-C3 hecho en conejo (panel izdo.) C) Media 2D representativa del complejo entre iC3b y el Fab C3-12.2. La posición de los distintos dominios fue determinada mediante comparación con imágenes de ME previamente obtenidas en el laboratorio. D) Imagen de ME del complejo C3dg-Fab C3-12.2. E) WB en condiciones reducidas empleando plasma activado humano, de ratón y de rata y C3dg humano purificado. F) Gel SDS-PAGE en condiciones reducidas teñido con coomassie del ensayo de inactivación de iC3b en presencia de CR1, FI y el mAb C3-12.2. La inactivación de iC3b se ilustra por la desaparición de la banda α 65 de iC3b y la generación de las bandas de C3c y C3dg.

Además de con el regulador CR1, también analizamos mediante ensayos de ELISA la interacción de iC3b con los receptores CR3 y CR4, ya que también había sido descrita la implicación del dominio TED en esta interacción. Al igual que ocurría con CR1, la presencia del mAb no impidió la unión entre los receptores y su ligando (resultados no mostrados).

Para mostrar si el C3-12.2 era capaz de reconocer los fragmentos de C3 iC3b/C3dg cuando éstos estaban depositados sobre superficies, empleamos ensayos de citometría e inmunofluorescencia. Para el ensayo de citometría utilizamos eritrocitos de un paciente HPN tratado con eculizumab. En estos pacientes se ha descrito que el depósito mayoritario está en las formas iC3b/C3dg (Risitano, et al., 2012). En la Figura 22.A se observa como el C3-12.2 es capaz de reconocer el depósito de fragmentos de C3 sobre los eritrocitos HPN. Para la inmunofluorescencia se emplearon secciones de tejido de riñón de un ratón deficiente en FH. Estos ratones desarrollan espontáneamente DDD, ya que la ausencia de FH impide la regulación de las AP C3-convertasas en fase fluida activándose todo el C3 plasmático (Pickering, et al., 2002). Como se muestra en la Figura 22.B, el C3-12.2 es capaz de detectar el depósito de C3 sobre la membrana basal glomerular.

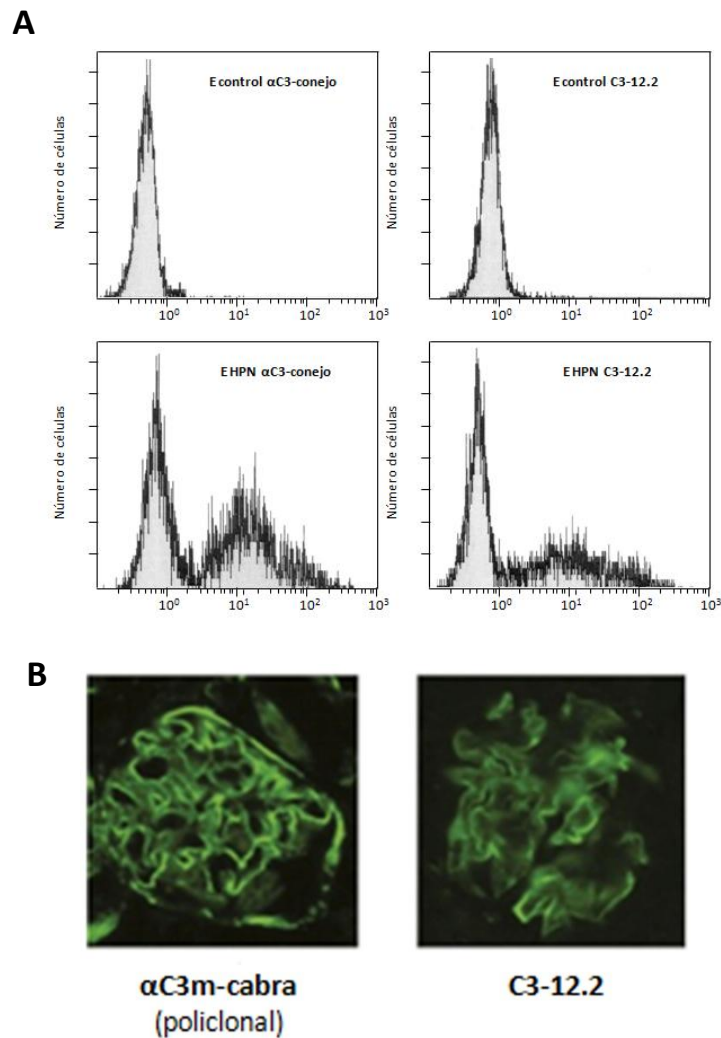


Figura 22. EL C3-12.2 reconoce los fragmentos iC3b/C3dg sobre superficies celulares. A) Ensayo de citometría para detectar fragmentos de C3 sobre los eritrocitos de un paciente HPN tratado con eculizumab y un individuo sano. Como control positivo se empleó un anticuerpo policlonal anti-C3 hecho en conejo (generado en el laboratorio). La figura muestra los resultados de un ensayo representativo de varios en los que se obtuvieron resultados similares. B) Inmunofluorescencia de secciones de riñón de un ratón deficiente en FH empleando un anticuerpo policlonal anti-C3 de ratón hecho en cabra (MP Biomedicals) y el C3-12.2. Imágenes obtenidas de Ruseva et al., 2013 (Ruseva, et al., 2013).

3. Evaluación de la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN.

Que el tratamiento con eculizumab ha mejorado radicalmente la calidad de vida de los pacientes HPN es un hecho. Pero sin embargo, las causas por las que parte de los pacientes pese a estar tratados con eculizumab continúan presentando anemia y requiriendo de transfusiones son aún desconocidas.

En vista de los estudios realizados en otras poblaciones de pacientes HPN, nos planteamos estudiar la situación clínica de nuestra cohorte de pacientes HPN tratados con eculizumab y buscar nuevas correlaciones entre los parámetros hemolíticos, niveles de eculizumab en plasma y determinaciones en complemento para ayudar a entender mejor estas diferencias entre pacientes en la respuesta al tratamiento con eculizumab.

3.1 Respuesta al tratamiento con eculizumab en la cohorte de HPN

Para la realización de este estudio se reunieron muestras de 12 pacientes HPN tratados con eculizumab provenientes de dos hospitales, el Hospital Clínico San Carlos de Madrid y el Hospital Puerta de Hierro en Majadahonda. Todos los pacientes estaban siendo tratados con eculizumab desde hace más de un año con una dosis de 900 mg cada 14 días, exceptuando tres pacientes, que debido a sus condiciones físicas (PNH008 y PNH018) y a su situación de anemia aplásica (PNH002) se les había incrementado la dosis a 1200 mg cada 14 días. Las muestras se recogieron durante dos ciclos continuos de eculizumab (4 semanas) en diferentes tiempos del ciclo; antes y después de la administración del eculizumab y en la semana intermedia entre dos ciclos (Figura 23). De esta manera podíamos determinar si había variaciones en los distintos parámetros que íbamos a evaluar a lo largo del ciclo o entre dos ciclos diferentes.

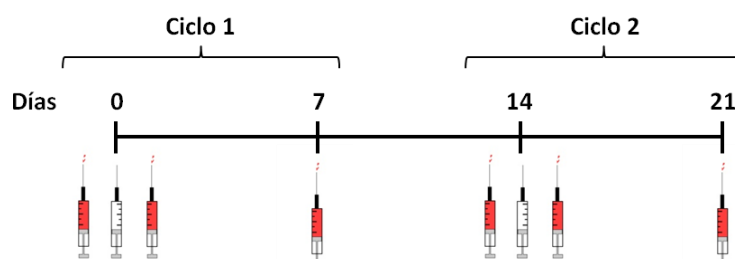


Figura 23. Diagrama de la toma de las muestras de los pacientes HPN. Administración de eculizumab (jeringuilla blanca) y recogida de muestra sanguínea (jeringuilla roja).

Al analizar los marcadores hematológicos de nuestra cohorte de pacientes HPN, observamos que el tratamiento con eculizumab había conseguido aumentar considerablemente los niveles de hemoglobina y reducir los de LDH, indicando por tanto que el eculizumab estaba bloqueando la hemólisis intravascular en estos pacientes (Tablas 3 y 4). Sin embargo, muchos de ellos mostraban parámetros que sugerían una ligera hemólisis persistente (Tabla 4). El 83% de los pacientes (10/12) presentaban un recuento de reticulocitos elevado, el 58% (7/12) no había recuperado los niveles normales de hemoglobina, el 50% (6/12) tenía niveles elevados de bilirrubina y el 42% (5/12) presentaba niveles ligeramente elevados de LDH en las muestras recogidas previas a la administración del eculizumab. Es importante destacar, que pese a presentar estos signos de hemólisis leve, los pacientes manifestaron haber mejorado considerablemente su calidad de vida y ninguno, excepto el PNH002 que sufría anemia aplásica, necesitó de transfusiones de hematíes desde que se inició el tratamiento.

Tabla 3. Comparativa marcadores hematológicos antes y durante el tratamiento con eculizumab.

Pacientes (n=12)			
Variable	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento	p-valor
Transfusiones	7.3 ± 10.7	0.2 ± 0.6	0.03
Hemoglobina	8 ± 2.5	11 ± 2	0.004
% Reticulocites	5.2 ± 2.5	7 ± 5	0.27
Bilirrubina	2.4 ± 2.2	2.8 ± 2.3	0.7
LDH	3552 ± 2025	451 ± 106	<0.001

Los valores representan la media ± DE para cada una de las variables de los 12 HPN de la cohorte. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t-Student.

Tabla 4. Determinaciones hematológicas en los pacientes HPN antes y durante el tratamiento con eculizumab. Los valores representan la media \pm DE de las determinaciones de todas las muestras recogidas a lo largo de los dos ciclos de eculizumab. El rango normal de cada una de las determinaciones se presenta entre paréntesis.

	Tipo HPN	Eventos trombóticos		Transfusiones por año		Hemoglobina (12-16 gr/dL)		% Reticulocitos (0.5-2 %)		LDH (240-480 U/L)		Bilirubina (0.2-2 mg/dL)		Genotipo CR1
		Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	
HPN 006	Clásica	No	No	16	0	8.4	15.7 \pm 0.4	4.5	7.9 \pm 2.8	2300	304 \pm 18	0.80	5.9 \pm 0.5	H/L
HPN 004	Clásica	No	No	1	0	10.2	9.7 \pm 0.2	1.3	7.3 \pm 2.3	1050	445 \pm 39	0.40	1.6 \pm 0.1	H/L
HPN 018	Clásica	No	No	12	0	2.9	9 \pm 0.3	4.4	13.7 \pm 0.5	3170	472 \pm 11	1.20	3 \pm 0.4	H/L
HPN 008	Clásica	No	No	37	0	4.4	9.5 \pm 0.5	4	15.6 \pm 1.8	2050	334 \pm 20	2.30	8.6 \pm 0.9	H/L
HPN 003	Clásica	No	No	8	0	8.4	9.6 \pm 0.4	3	10.5 \pm 1.6	3001	338 \pm 9	1.70	1.4 \pm 0.1	H/H
HPN 033	Clásica	No	No	2	0	7	10.2 \pm 0.3	5.9	11.6 \pm 0.3	1683	591 \pm 46	1.90	3.8 \pm 0.7	H/H
HPN 005	Clásica	No	No	0	0	9.8	12 \pm 0.5	8.6	2.9 \pm 0.5	6000	526 \pm 22	8.80	1.9 \pm 0.4	H/H
HPN 001	Clásica	Yes	No	0	0	12.4	12.4 \pm 0.2	2.8	1.1 \pm 0.4	3600	525 \pm 19	1.00	0.6 \pm 0.1	H/H
HPN 002	AA-HPN	No	No	8	2	8.9	9.3 \pm 0.2	10.1	4.7 \pm 0.6	2800	634 \pm 50	3.20	2.1 \pm 0.1	H/H
HPN 030	Clásica	No	No	2	0	8	10.5 \pm 0.1	6.9	5.6 \pm 0.5	8304	489 \pm 12	2.50	2.1 \pm 0.2	H/H
HPN 014	Clásica	No	No	2	0	6.7	12.8 \pm 0.3	4.8	3.7 \pm 0.6	3728	393 \pm 10	3.00	1 \pm 0.1	H/H
HPN 026	Clásica	No	No	0	0	9	11.5 \pm 0.5	6.4	0.1 \pm 0.01	4942	368 \pm 27	2.00	1.1 \pm 0.1	H/H

Basándonos en los resultados de estudios anteriores, comenzamos por estudiar si el origen de la hemólisis residual que presentaban algunos de los pacientes HPN se atribuía a la hemólisis extravascular. Para ello analizamos la población de eritrocitos HPN y el depósito de fragmentos de C3 en nuestra cohorte de pacientes así como el polimorfismo en *CR1*.

3.2 Los pacientes HPN con un mayor porcentaje de eritrocitos opsonizados con C3 presentaban signos de hemólisis extravascular

La determinación del tamaño de clon HPN y del depósito de C3 sobre estos eritrocitos se hizo mediante citometría de flujo de doble color usando un anticuerpo anti-CD59-PE y un policlonal anti-C3 humano hecho en conejo (generado en el laboratorio)(Tabla 5 y Figura 26). Observamos que en nuestra población había una gran variabilidad en el tamaño del clon HPN (E-HPN CD59⁺) entre pacientes, encontrando desde pacientes que presentaban un tamaño de clon del 20% hasta pacientes con un tamaño de clon de alrededor de un 90%, siendo la media de un $65 \pm 24\%$. Este porcentaje permanecía muy estable en cada paciente a lo largo de los dos ciclos de eculizumab (Figura 24.A). Nos llamó la atención que no existía correlación entre el tamaño de clon CD59⁺ que nosotros cuantificábamos por citometría con el porcentaje de granulocitos HPN determinado por FLAER. En la determinación por FLAER, el tamaño del clon HPN en los pacientes era considerablemente mayor, siendo la media de un $82 \pm 18\%$ (Tabla 5).

Tabla 5. Tamaño y opsonización con C3 del clon HPN. Relación con niveles plasmáticos de C3.

	FLAER Granulocitos	% E-HPN	% E C3 ⁺	Coombs	Plasma C3 (85-135mg/dL)	Genotipo CR1
HPN 006	98.5	94.1 ± 0.3	64.8 ± 2.4	+	59 ± 11.5	H/L
HPN 004	92.4	92.5 ± 0.3	35.7 ± 1.81	+	87 ± 8.1	H/L
HPN 018	61.8	81.2 ± 1.7	36.3 ± 2.2	+	80.5 ± 5.1	H/L
HPN 008	97.6	76.5 ± 2.4	61.7 ± 1	+	53.5 ± 1.8	H/L
HPN 003	88	63.7 ± 0.2	14.6 ± 1.1	+	104.2 ± 15	H/H
HPN 033	92.7	79.1 ± 1.2	47.9 ± 1.7	+	93 ± 5.9	H/H
HPN 005	91.2	70.5 ± 1.7	27.3 ± 2.2	+	95.1 ± 6.2	H/H
HPN 001	51	26.9 ± 1.8	1 ± 0.1	-	107.2 ± 9.1	H/H
HPN 002	51.2	43.9 ± 1.2	8.8 ± 1.3	-	105.4 ± 11.4	H/H
HPN 030	87.7	61.1 ± 0.7	11.8 ± 2	-	121.2 ± 15.3	H/H
HPN 014	78.3	72.7 ± 0.2	21.3 ± 1.4	-	109.6 ± 8.4	H/H
HPN 026	98.7	20.2 ± 1.6	8.1 ± 1.5	-	89.8 ± 7.5	H/H

Los valores representan la media ± DE de las determinaciones de cada paciente en todos los puntos estudio.

Respecto al porcentaje de células opsonizadas con fragmentos de C3, observamos que éste también se mantenía estable a lo largo del periodo del estudio y encontramos una variabilidad entre pacientes semejante a la observada en el clon HPN, con una media de E-HPN C3⁺ del 28 ± 21% (Figura 24.B). De hecho, hayamos correlación entre ambos porcentajes ($r^2 = 0.64$; $p < 0.02$), de manera que aquellos pacientes con un mayor porcentaje de eritrocitos HPN también eran aquellos con un mayor porcentaje de eritrocitos C3⁺ (PNH006, PNH004, PNH018, PNH008 y PNH033)(Figura 24.C). Siete pacientes de nuestra cohorte resultaron Coombs positivos coincidiendo, a excepción de uno, con aquellos pacientes que tenían más de un 25% de sus eritrocitos HPN opsonizados con C3 (Tabla 5). Los parámetros de niveles de bilirrubina elevados y el alto recuento de reticulocitos se consideran parámetros característicos de la hemólisis extravascular. Curiosamente, presentaban niveles de bilirrubina (1.4 ± 0.6 mg/dL vs 4.1 ± 2.7 mg/dL $p=0.034$) y recuento de reticulocitos (4.3 ± 3.7 % vs 9.8 ± 4.7 %; $p=0.046$) significativamente más elevados aquellos pacientes con más de un 25% de sus eritrocitos opsonizados con C3 en comparación con aquellos que presentaban menor porcentaje (Figura 25 A y B).

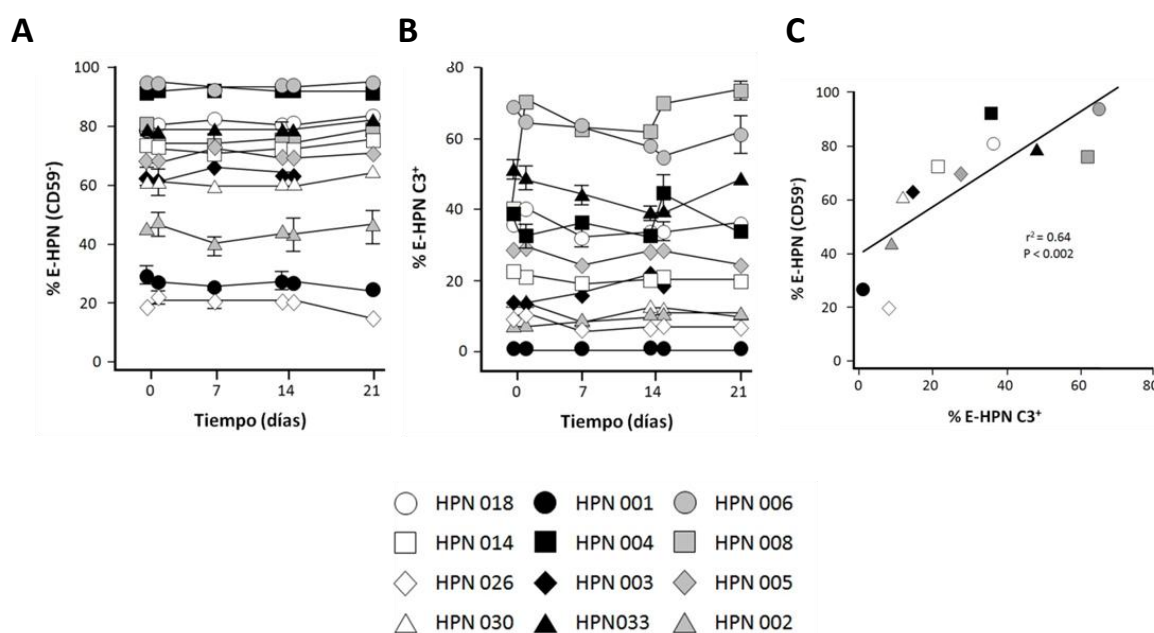


Figura 24. Correlación positiva entre el porcentaje de E-HPN y el porcentaje de E-HPN C3⁺. A) Determinación del porcentaje de E-HPN (deficientes en CD59⁻) por citometría usando un mAb CD59-PE en las muestras recogidas en cada punto del estudio. B) Determinación del porcentaje de E-HPN C3⁺ por citometría usando un Ab policlonal anti-C3 hecho en conejo en las muestras recogidas en cada punto del estudio. Las muestras del día 0 y 14 corresponden a aquellas recogidas antes y después de la administración del eculizumab mientras que las de los días 7 y 21 son las recogidas en el medio del ciclo. Cada punto se corresponde a la media ± DE de tres experimentos independientes. C) Correlación de Pearson entre el % de E-HPN y el de E-HPN C3⁺ de las medias de los valores de todos los puntos de cada paciente. La correspondencia entre los símbolos y los pacientes se detalla al final de la figura.

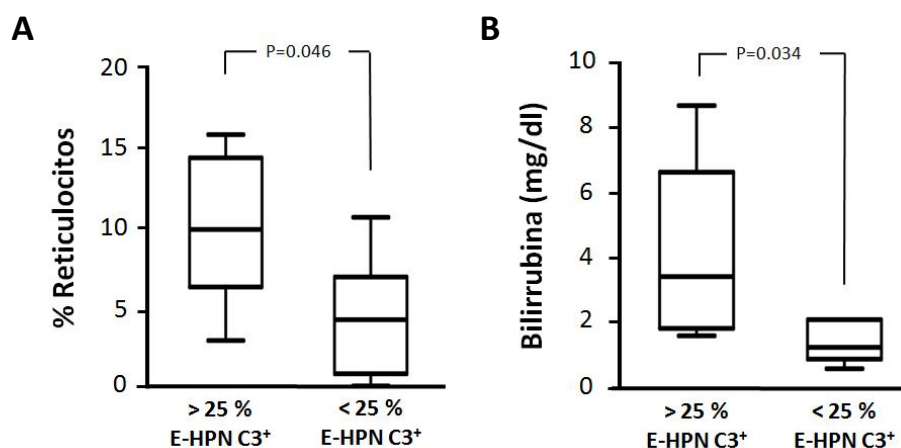


Figura 25. Los pacientes con un mayor porcentaje E-HPN C3⁺ tienen mayor recuento de reticulocitos y mayores niveles de bilirrubina. Las figuras representan la comparación del % de reticulocitos (A) y de los niveles de bilirrubina (B) entre dos grupos de pacientes HPN: el que presentan más del 25% de sus E-HPN opsonizados con C3 y el que tiene menos del 25% de sus E-HPN opsonizados con C3. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t-Student.

3.3 Correlación entre niveles más bajos de CR1 con un mayor porcentaje de eritrocitos HPN C3⁺

Los niveles de expresión de CR1 en eritrocitos vienen determinados por la presencia de dos alelos: el alelo *CR1-H*, de alta expresión, y el alelo *CR1-L*, de baja expresión. Basándonos en el estudio de Rondelli et al. en el que se describía que existía una correlación entre los niveles de CR1 y la opsonización de los E-HPN con C3, genotipamos a la cohorte de pacientes HPN para el polimorfismo en *CR1* para analizar cómo influían los niveles de expresión de este regulador en el depósito de C3 en nuestros pacientes. Cuatro de ellos resultaron heterocigotos *CR1-H/CR1-L* (PNH006, PNH 004, PNH018 y PNH008) y los ocho restantes homocigotos *CR1-H*. Los cuatro pacientes *CR1-H/CR1-L* pertenecían al grupo de pacientes con más de un 25% de sus eritrocitos HPN C3⁺ y todos eran Coombs positivos (Tabla 3). De hecho, encontramos diferencias significativas en el porcentaje de E-HPN C3⁺ entre los pacientes *CR1-H/CR1-L* y *CR1-H/CR1-H* (Figura 26.A). De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, estos pacientes presentaban un mayor recuento de reticulocitos (5.1 ± 4 vs 11.1 ± 4.1 mg/dL; $p=0.026$) y mayores niveles de bilirrubina en plasma (1.7 ± 1 vs $4.8 \pm 3\%$) que aquellos pacientes homocigotos *CR1-H*. Además, estos pacientes eran los que habían requerido de un mayor número de transfusiones al año antes de iniciar el tratamiento con eculizumab (Tabla 3).

3.4 Los pacientes *CR1-H/CR1-L* presentan consumo de C3.

Nos planteamos estudiar cómo afectaría esta peor regulación de la activación de complemento en los pacientes HPN *CR1-H/CR1-L* a los niveles en plasma de proteínas de complemento, y observamos, que estos cuatro pacientes presentaban niveles de C3 por debajo del rango normal y significativamente más bajos que los del grupo *CR1-H/CR1-H* (Figura 26.B), sugiriendo que la activación constitutiva de complemento estaba consumiendo el C3 en estos pacientes. Para analizar si esta deficiencia en los niveles de C3 tenía alguna consecuencia clínica, buscamos en los historiales médicos de la cohorte de pacientes HPN si habían padecido infecciones severas o recurrentes. Curiosamente, sólo tres pacientes las habían sufrido durante el tratamiento (HPN002, HPN008 y PHPN018). El HPN002 es el paciente con anemia aplásica, con unos niveles muy reducidos de neutrófilos, causantes probablemente de las infecciones sucesivas que había padecido. El HPN008 y HPN018 son heterocigotos *CR1-H/CR1-L*, y requirieron de hospitalización durante 10 y 4 días, respectivamente, debido a una infección severa de origen desconocido (*N. meningitidis* descartada). Ambos respondieron bien al tratamiento con antibióticos de amplio espectro aunque requirieron de una dosis adicional de eculizumab para poder controlar la hemólisis.

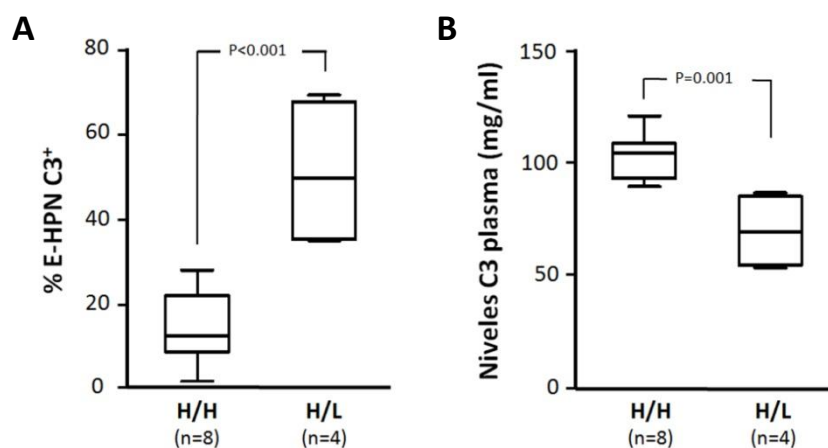


Figura 26. El alelo *CR1-L* se asocia con mayor porcentaje E-HPN C3⁺ y menores niveles de C3 en plasma. Las figuras representan la comparación del % de E-HPN C3⁺ (A) y de los niveles de C3 plasmáticos (B) entre el grupo de pacientes *CR1-H/CR1-H* y el grupo *CR1-H/CR1-L*. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t-Student.

3.5 Polimorfismos en otros genes de complemento

Además de analizar el polimorfismo genético en CR1, nos pareció interesante analizar otras variantes genéticas en otros genes reguladores del complemento. Concretamente analizamos el polimorfismo de riesgo para SHUa en MCP, el haplotipo de FH y el de FHR1. En nuestra cohorte de pacientes no observamos que existiese ninguna correlación entre ninguna de estas variantes y el depósito de C3 en los eritrocitos o los parámetros de hemólisis extravascular.

3.6 Niveles de eculizumab libre y actividad CH50: La activación de C5 está bloqueada

Otra de las hipótesis propuestas para explicar la hemólisis que presentan algunos pacientes HPN es la presencia de C5 libre como consecuencia de niveles insuficientes de eculizumab en plasma (Peffault de Latour, et al., 2015). Para evaluar si la hemólisis residual que presentaban nuestros pacientes HPN era consecuencia de este bloqueo incompleto de C5 medimos los niveles de eculizumab libre y de C5b-9 soluble, y determinamos la actividad CH50 de las diferentes muestras obtenidas a los largo de los dos ciclos de cada uno de los pacientes HPN.

Lo primero que hicimos fue calcular el nivel mínimo de eculizumab que debía contener una muestra para bloquear por completo su actividad hemolítica. Para ello, añadimos a una muestra de suero control concentraciones crecientes de eculizumab, y sobre estas muestras se realizó un ensayo CH50 y un ELISA para detectar los niveles de eculizumab libre. Determinamos que el nivel crítico de eculizumab para inhibir la vía terminal de complemento era de $110 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ (Figura 27.A).

Al medir los niveles de eculizumab libre en las diferentes muestras de nuestra cohorte de pacientes observamos que, tal y como cabría esperar, los niveles de eculizumab aumentaban tras la administración del anticuerpo, e iban disminuyendo progresivamente a lo largo que avanzaba el ciclo (Figura 30). Únicamente en dos de los pacientes, el HPN003 y el HPN006, los niveles de eculizumab estaban ligeramente por debajo del valor mínimo ($110 \pm 9 \mu\text{g/mL}$) en las muestras previas al tratamiento con eculizumab (Figura 27.B y Figura 28). En otros dos pacientes, el HPN030 y el HPN033, sus niveles se situaban próximos a este valor en estas mismas muestras. Sin embargo, el ensayo CH50 resultó negativo para todas las muestras analizadas, consistente también con las determinaciones de sC5b-9, del que sólo se encontraron trazas en algunas muestras (Figura 28). Estos resultados nos estaban indicando

que la activación de C5 estaba bloqueada en todas las muestras a pesar de que algunas presentarían niveles de eculizumab libre próximos al valor crítico.

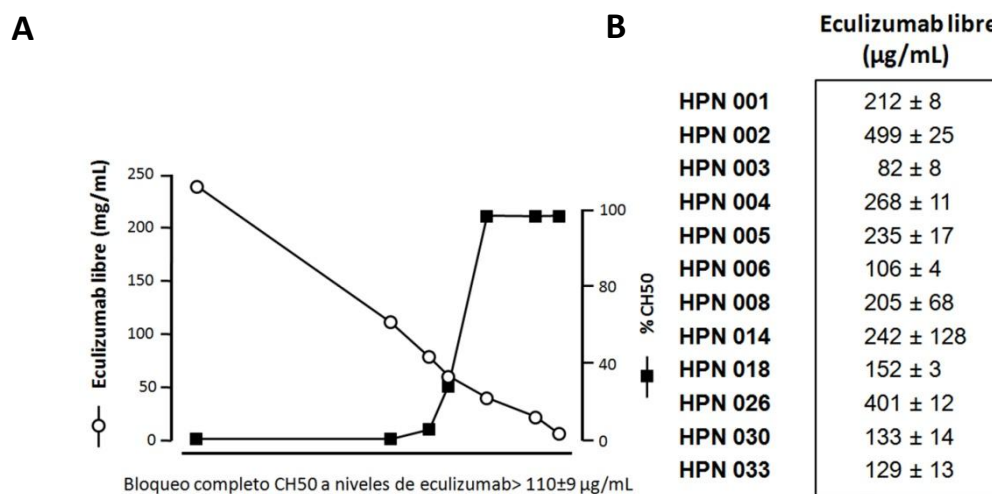


Figura 27. Cuantificación de los niveles de eculizumab libre plasmáticos de los pacientes HPN. A) Determinación del nivel mínimo de eculizumab libre necesario para inhibir completamente la actividad lítica de un suero calculado como % de lisis en un ensayo CH50. B) Cuantificación de los niveles de eculizumab libre del plasma de los pacientes HPN en las muestras previas a la administración de eculizumab. Los valores representan la media ± DE de las muestras del día 0 y 14 previas al tratamiento con eculizumab.

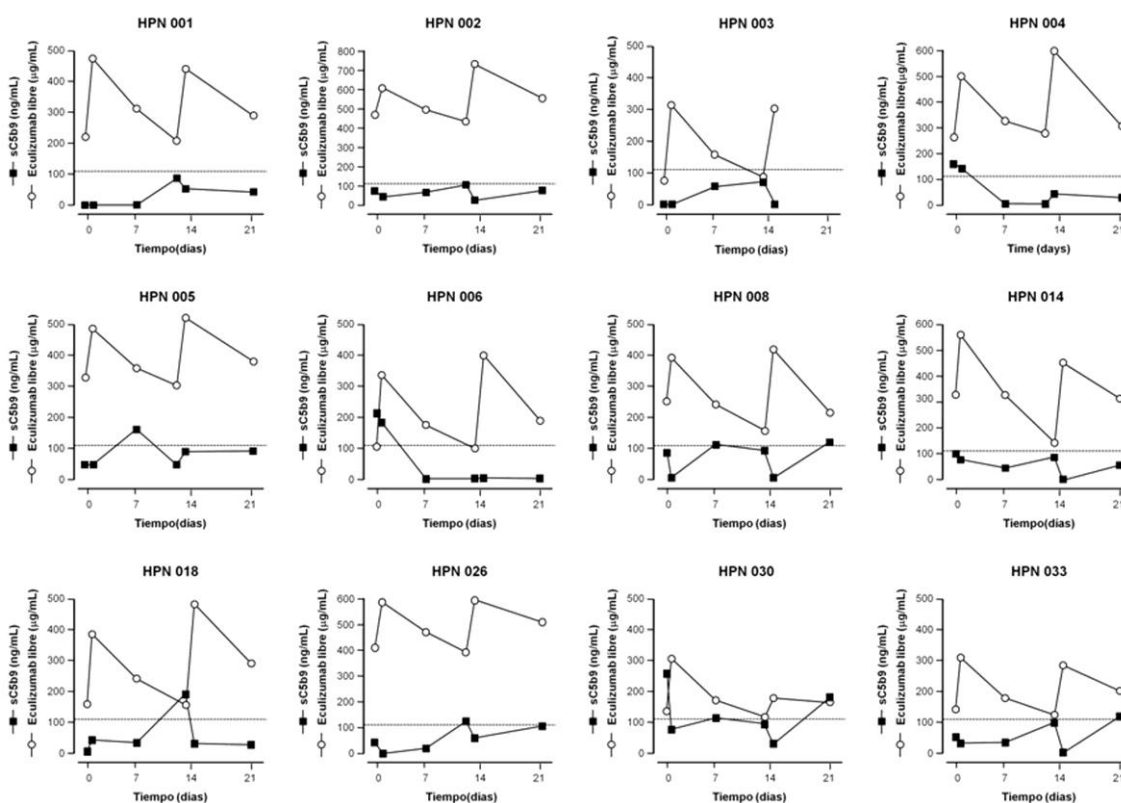


Figura 28. Variaciones en los niveles de eculizumab libre y sC5b-9 en cada paciente HPN durante los dos ciclos de eculizumab. Cada punto representa la media de dos determinaciones de eculizumab libre (círculos blancos) y sC5b-9 (cuadrados negros) de cada una de las muestras recogidas a lo largo de los dos ciclos de eculizumab. La línea horizontal representa el nivel

mínimo de eculizumab libre requerido para bloquear la actividad lítica del suero. A su vez, también representa el valor máximo de sC5b-9 de un plasma control, calculado usando el programa reference value advisor v2.1 (Geffre, et al., 2011).

Reforzando estos resultados, cuando comparamos los parámetros hemolíticos y de complemento entre este grupo de pacientes con los niveles de medios de eculizumab libre más bajos (inferiores a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y el resto de pacientes con niveles medios de eculizumab más altos (superiores a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no observamos ninguna diferencia (Tabla 6).

Tabla 6. Estudio comparativo de las determinaciones hemolíticas y en complemento entre los pacientes HPN de acuerdo con los niveles de eculizumab libre.

Variable	Total n= 12	Ecu libre >150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n= 8	Ecu libre <150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n=4	p-valor
Edad (yr)	47.8	48.6 \pm 16	46 \pm 7	0.8
Género masculino (n)	8 (67 %)	5 (63%)	3 (75%)	1
Plasma C3	90.4 \pm 21	89.2 \pm 18	89.3 \pm 27	1
CR1 H/L	4 (33 %)	3 (38%)	1 (25%)	1
FLAER Granulocitos	82.4 \pm 18	77.8 \pm 20	91.8 \pm 5	0.22
% E-HPN	65.3 \pm 24	60.6 \pm 27	74.5 \pm 26	0.36
% E-HPN C3 ⁺	28 \pm 20	21.3 \pm 14	34.8 \pm 23	0.26
Coombs +	7 (58%)	4 (50%)	3 (75%)	0.58
Hemoglobina	11.5 \pm 2	10.8 \pm 2	11.5 \pm 3	0.6
% Reticulocitos	7.1 \pm 5	6.1 \pm 6	8.9 \pm 3	0.39
Bilirrubina	2.8 \pm 3	2.5 \pm 3	3.2 \pm 2	0.6
LDH	450 \pm 107	462 \pm 99	430 \pm 134	0.7
Eculizumab libre	217 \pm 111	268 \pm 100	113 \pm 24	0.01

Los valores representan la media \pm DE de todas las cuantificaciones determinadas para cada una de las variables a lo largo de los dos ciclos de eculizumab. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t-Student para comparar variables continuas y el test exacto de Fisher para comparar variables cualitativas.

Discusión

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales en proteínas de complemento con potenciales aplicaciones en terapia y diagnosis.

El eculizumab es un anticuerpo anti-C5 que bloquea la activación de C5 impidiendo la generación de la anafilotoxina C5a y del MAC, y actualmente está autorizado para el tratamiento de SHUa y HPN. En ambas enfermedades, el tratamiento con eculizumab ha demostrado gran eficacia, reduciendo la hemólisis y mejorando la función renal respectivamente (Brodsky, et al., 2008, Hillmen, et al., 2007, Hillmen, et al., 2006). Ha sido precisamente este éxito del eculizumab en el tratamiento de SHUa y HPN, junto con la implicación del complemento en el desarrollo de otras muchas patologías, lo que ha resucitado el interés en la modulación de la respuesta de complemento con fines terapéuticos. A medida que aumenta el conocimiento en la fisiopatología de las enfermedades de complemento, parece más evidente que una única terapia como el eculizumab, no va a dar respuesta a todas las necesidades clínicas.

A ello, además, hay que sumarle el coste del eculizumab y su administración; Hasta la fecha, no hay ningún otro fármaco disponible para el tratamiento de SHUa y HPN, por lo que la ausencia de competidores ha permitido que el eculizumab alcance unos precios muy elevados. La administración del eculizumab se realiza por vía intravenosa, con una única dosis cada dos semanas. Esto hace del eculizumab un tratamiento muy incómodo para los pacientes, sobre todo en el caso de enfermos crónicos, que tienen que pasarse varias horas en el hospital para que se lo suministren y que no pueden hacer planes más allá de dos semanas.

La continua información aportada por los estudios de genéticos y estructurales en proteínas del complemento, junto con el desarrollo de modelos animales de enfermedades asociadas con desregulación del complemento, han sentado las bases para la generación de nuevas líneas de terapias anti-complemento.

Uno de estos nuevos abordajes consiste en el bloqueo de la vía de amplificación de la respuesta de complemento, ya sea impidiendo la formación de la AP C3-convertasa o favoreciendo su disociación. La eficacia de la respuesta de complemento depende en un 80% de loop de amplificación de la vía alternativa (Harboe, et al., 2004, Harboe, et al., 2009), luego al inhibir la AP C3-convertasa, estaremos bloqueando la respuesta del complemento independientemente de la vía que haya desencadenado la activación. Otra de las ventajas de la inhibición al nivel de la AP C3-convertasa es que se evita el consumo de C3 y la generación de fragmentos activos de C3 que puedan mediar fagocitosis e inflamación (Erdei, et al., 2016, Jaffe, et al., 1976, Ross and Lambris, 1982).

En el laboratorio hemos producido un panel de anticuerpos monoclonales generados en ratón capaces de bloquear la activación de C3; el mAb FB 28.4.2, que al unirse a FB bloquea la formación de la AP C3-proconvertasa y tres mAbs anti-C3, el C3-12.17 y C3-42.3 que bloquean la unión de C3 a la AP C3-convertasa y el C3-16.4 que impide la unión de C3 a FB.

1. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a FB

El FB-28.4.2 fue seleccionado de entre la colección de mAbs anti-FB por su capacidad de bloquear la formación de la AP C3-convertasa.

El FB 28.4.2 reconoce con alta afinidad ($KD: 3.55 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) el fragmento Ba de FB humano. En ensayos de RPS, pre-incubando el FB28.4.2 con FB, demostramos que esta unión estaba bloqueando los sitios de interacción en FB con C3b, impidiendo así la formación de la AP C3-proconvertasa. Debido a la rápida disociación del complejo C3bB, no hemos sido capaces de mostrar si la inyección de FB28.4.2 sería capaz de disociar este complejo. De cualquier modo, no creemos que este hecho tenga ninguna relevancia clínica, ya que como se demuestra en los distintos ensayos hemolíticos y modelos de enfermedad en los que se ha probado, el FB28.4.2 inhibe eficazmente la activación de complemento.

Además del FB humano, el FB28.4.2 también reconocía por WB el FB de otros mamíferos y era capaz de inhibir la actividad hemolítica del suero de algunas de estas especies, revelando así que el epítipo con el que interaccionaba el FB28.4.2 estaba conservado en la evolución. El hecho de que esté conservado apoya la relevancia de este residuo en la molécula de FB para desarrollar su función.

En conjunto, y coincidiendo con los datos aportados por el polimorfismo en FB R32Q (Montes, et al., 2009), estos datos resaltaban una vez más la importancia de la interacción entre el dominio Ba de FB y C3b para que el FB adopte la configuración abierta y pueda ser cortado por FD.

Para demostrar el posible uso del FB28.4.2 como agente terapéutico hemos estudiado el efecto del anticuerpo en distintos modelos de enfermedad asociados a desregulación del complemento. En el modelo ex vivo de HPN, el FB28.4.2 además de prevenir la lisis de los eritrocitos HPN cuando estos eran expuestos a un NHS, también impedía la opsonización con fragmentos de C3 de los eritrocitos de conejo a diferencia de lo que ocurría con eculizumab. El eculizumab, al actuar como inhibidor de C5, no protege a los eritrocitos de la opsonización con los fragmentos derivados de la activación de C3. En algunos pacientes HPN esta opsonización

deriva en hemólisis extravascular, ocasionando de nuevo problemas de anemia. El FB28.4.2, al inhibir la formación de la AP C3-convertasa, bloquearía la hemólisis intravascular e impediría que se desarrollara la hemólisis extravascular, mejorando por tanto el tratamiento actual de estos pacientes HPN.

Otro modelo en el que el FB28.4.2 mostró gran efectividad fue en el modelo in vitro de SHUa con células HMEC-1. En los pacientes con SHUa, la desregulación del complemento ocurre sobre las superficies celulares, causando graves daños en el endotelio. En este modelo, en el que las células HMEC-1 activadas se incubaban con suero de un paciente de aSHU, el tratamiento con el FB28.4.2 bloqueaba completamente tanto el depósito de fragmentos C3 como de C5b-9, evitando por tanto el posible daño endotelial. Es importante destacar que la inhibición conseguida por el FB28.4.2 era equiparable a la del sCR1, probando que el FB28.4.2 muestra una eficiencia para controlar la activación del complemento similar a la de un regulador del complemento.

Por último, tras el éxito del FB28.4.2 en dos modelos ex vivo en los que la desregulación de la vía alternativa es fundamental para la aparición de la enfermedad, probamos el uso del FB28.4.2 como terapia en un modelo in vivo en ratas con miastenia gravis, enfermedad en la que la activación del complemento está mediada por la vía clásica. El tratamiento con una única dosis de FB28.4.2 fue suficiente para bloquear la actividad del complemento en el suero de las ratas incluso pasadas 48h desde su administración, lo que se tradujo en una inhibición de la lisis mediada por complemento de las placas motora. Como consecuencia, las ratas tratadas con FB28.4.2 no manifestaron ninguno de los síntomas típicos de la enfermedad como la pérdida de peso o la debilidad muscular. Estos resultados, coincidiendo con la idea de que la vía alternativa contribuye en alrededor de un 80% a la respuesta del complemento, apoyan el uso de terapias que bloqueen la vía alternativa para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que el sistema del complemento juegue un papel crucial ya sea en su aparición o en su desarrollo, independientemente de cuál haya sido la vía iniciadora de la respuesta.

Actualmente se están desarrollando diversas estrategias para inhibir la activación de la vía alternativa, y en concreto, varias empresas farmacéuticas ya están testando moléculas anti-FB en diversos ensayos clínicos; el mAb 1379 (TA106, Taligen) es un mAb que al igual que el FB28.4.2, ha mostrado gran eficacia en un modelo in vivo de enfermedad asociado a la activación de la vía clásica, el síndrome antifosfolípidos asociado a pérdida fetal (Thurman, et al., 2005), y que actualmente está siendo humanizado para ser probado en ensayos clínicos de

asma y DMAE. Bikaciomab y Novelmed han desarrollado mAbs anti-FB que están en fase preclínica para el tratamiento de DMAE, así como moléculas pequeñas inhibitorias (Novartis) de las cuales no hay evidencias de haber entrado en ningún ensayo. En conjunto, estos datos resaltan el desarrollo de terapias dirigidas frente a FB como moduladores de la respuesta de complemento, que podrían ser usadas en enfermedades tan comunes como el asma o DMAE (Taube, et al., 2006). Dada la efectividad con la que el FB28.4.2 había mostrado inhibir la activación del complemento tanto en modelos *ex vivo* como *in vivo* de patologías del complemento, el FB28.4.2 se patentó por el CSIC en 2013. Creemos, que tras su humanización, el FB28.4.2 podría sumarse a esta lista de moléculas terapéuticas para ser probado en ensayos clínicos.

2. Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a C3

Los mAbs anti-C3, además de cómo herramientas terapéuticas para la modulación de la activación de C3, también nos pueden servir como biomarcadores diagnósticos, revelándonos los lugares donde se está activando C3 (Gorham, et al., 2015, Mollnes, et al., 1986, Sargsyan, et al., 2012, Schulze, et al., 1993, Serkova, et al., 2010, Thurman, et al., 2013).

En el laboratorio hemos generado mediante la inmunización con fragmentos de C3 (C3b, iC3b y C3dg) de ratones deficientes en C3 un repertorio de mAbs que cumplirían con algunas de las funciones anteriormente descritas: Los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 podrían desarrollarse como herramientas terapéuticas y el C3-12.2 como herramienta diagnóstica.

Los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 reconocen con alta afinidad tanto C3 como C3b e iC3b, mostrando unas K_Ds que demuestran la alta afinidad de estos mAbs hacia estas moléculas. Los tres mAbs inhiben la activación de la vía AP pero por mecanismos diferentes.

A partir de las estructuras de C5 en complejo con CVF (Laursen, et al., 2011) y de C3bBb estabilizada con SCIN (Rooijackers, et al., 2009), hoy se puede especular acerca de los dominios de interacción entre la AP-C3 convertasa y su sustrato, C3. Se propone un modelo en el los dominios MG4-MG5 de C3b interaccionarían con los dominios MG4-MG5 de C3 en una interfaz, y los dominios MG6-MG7 de C3b interaccionarían con el MG7 de C3 en una segunda interfaz. El mismo modelo se aplicaría para el reconocimiento entre la C5-convertasa y C5. Los mecanismos moleculares descritos para un par de mutaciones en C3 sumarían apoyos para este modelo de interacción; La mutación C3 923ΔDG (Martinez-Barricarte, et al., 2010), localizada en el dominio MG7, es una mutación ganancia de función que genera una AP C3-

convertasa que no puede ser regulada por FH. Pero además, esta mutación impide a la AP C3-convertasa cortar el C3 mutante. La mutación C3 M373T (Sfyrøera, et al., 2015), localizada en el MG4, produce un cambio conformacional en C3 de tal manera que tampoco puede ser activado por la AP C3-convertasa.

Las imágenes en 3D por ME revelaron que los mAbs C3-12.17 y C3-42.3 reconocían el C3b por regiones diferentes pero contiguas que abarcan los dominios MG3, MG4 y MG5. Los ensayos de activación de C3 mostraron que en presencia de estos mAbs, se formaba la AP C3-convertasa, ya que el FB se cortaba, pero que sin embargo el C3 no se activaba. En conjunto, y siguiendo la línea propuesta por el modelo convertasa-sustrato, los mAbs estarían bloqueando los sitios de interacción entre la AP-C3 convertasa y C3, ofreciendo por tanto un dato más que apoyaría la implicación del MG4-MG5 en el reconocimiento entre la AP C3-convertasa y C3. En la Figura 29 se ilustra cómo la unión de estos mAbs afectaría a la unión entre el C3 y la AP C3-convertasa.

A diferencia de la estructura de la AP C3-convertasa unida a C3, la estructura de la AP C3-proconvertasa y de la AP C3-convertasa sí están bien caracterizadas (Forneris, et al., 2010, Janssen, et al., 2009, Torreira, et al., 2009, Torreira, et al., 2009). En el primer reconocimiento, los dominios α NT, CUB y MG7 de C3b interaccionan con el dominio Ba de FB y la región C345c con el dominio vWa de FB. Tras la escisión de la región Ba, el FB se mantiene unido a C3b mediante el dominio vWa.

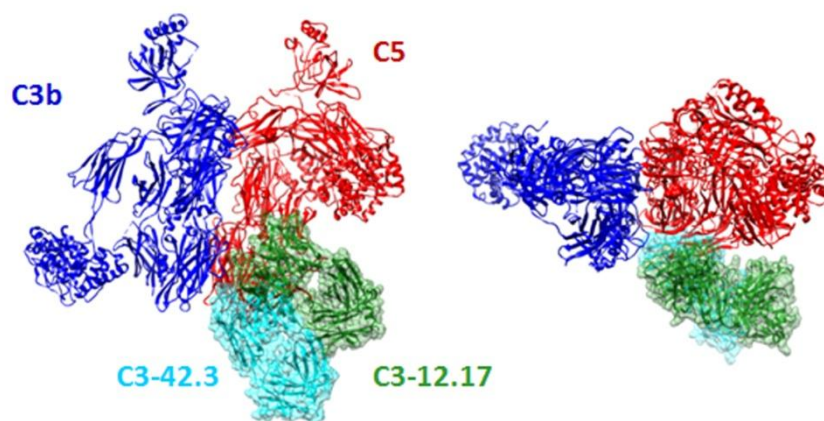


Figura 29. Mecanismo de inhibición de los mAbs C3-12.17 y C3-42.3. Modificación de la estructura de C5-CVF (PDB ID: 3PVM)(Janssen, et al., 2009) en la que se ha sustituido el CVF por la molécula de C3b para mostrar los propuestos sitios de interacción entre el C3 y la AP C3-convertasa. Sobre esta estructura se han representado los mAbs C3-42.3 (azul claro) y el C3-12.17 (verde). A) Vista lateral. B) Vista superior.

El mAb C3-16.4, al contrario de lo que ocurría con el C3-12.17 o el C3-42.3, inhibía la activación de la AP al bloquear la formación de la AP C3-convertasa. La estructura en 3D del complejo C3b-Fab C3-16.4 mostró que el mAb se unía a C3b por una región entre el MG2-MG6. Sin embargo, al superponer la estructura del complejo C3bBb (Forneris, et al., 2010) (PDB 2XWJ) con la estructura en 3D del C3b con el Fab del C3-16.4 vimos que la región de unión del mAb no solapaba con las zonas de interacción del C3b con el FB, de manera que el C3-16.4 debía producir un cambio en la estructura de C3 que le impidiera unirse a FB. Nos llamó la atención, que sin embargo, el C3-16.4 no fuera capaz de bloquear la activación del complemento cuando el C3b estaba depositado sobre la superficie. Una posible explicación a este hecho sería que cuando el C3b está depositado sobre la superficie la región de interacción con el C3-16.4 no quede accesible para el mAb. Como los eritrocitos HPN tratados con eculizumab están altamente opsonizados con C3b, se generan fácilmente AP C3-convertasas en superficie que amplifican la respuesta del complemento conduciendo a la lisis de los eritrocitos. Sin embargo, es importante mencionar, que esta situación nunca sucedería en el caso de que los pacientes HPN fueran tratados con este mAb, ya que al inhibir la formación de la AP C3-convertasa, no se generaría C3b que pudiera opsonizar los eritrocitos.

El C3-16.4, además, era el único mAb que inhibía la proteólisis de C3b a iC3b mediada por FH y FI (Datos no mostrados). En la estructura cristalográfica de C3b con los 4 primeros SCR de FH (Wu, et al., 2009) no se observó interacción directa entre FH y los dominios MG2 o MG6, y de hecho, al superponer los 4 SCR de FH con la estructura del complejo C3b-Fab C3-16.4, al igual que pasaba con el FB, la zona de interacción de FH con C3b estaba alejada de la región de interacción del C3-16.4 con C3b. Aun así, es posible pensar que dada la disposición adoptada por los SCR1-4 de FH a lo largo de la molécula de C3b, el cambio en la estructura de C3b que provoca la unión de este mAb afecte también al posicionamiento de FH y que por tanto no pueda actuar como cofactor para FI.

La eficacia de los tres mAbs como posible tratamiento para enfermedades asociadas a desregulación de complemento fue evaluada mediante dos modelos in vitro de SHUa y C3G y un modelo ex vivo de HPN. En todos los ensayos, los tres mAbs anti-C3 mostraron grandes capacidades como futuros agentes terapéuticos, consiguiendo una inhibición de la activación del complemento a concentraciones por debajo de las equimolares con C3.

La C3G engloba a un conjunto de enfermedades renales que tienen en común un patrón, el depósito predominante de C3 a nivel glomerular en ausencia de IgGs como consecuencia de la desregulación de la vía alternativa del complemento. Pero dentro de este

grupo, los mecanismos patogénicos son heterogéneos, encontrando desde mutaciones de ganancia de función en C3 y autoanticuerpos frente a la C3-convertasa hasta reordenamientos en los genes de los *CFHR* que aumentan su competición con FH (Xiao, et al., 2014). Si bien es cierto que hasta la fecha no hay reconocido ningún tratamiento específico para la C3G, sí se han publicado estudios mostrando los resultados a diferentes tipos de tratamiento, y en general, las respuestas han sido heterogéneas (Nester and Smith, 2013, Pickering, et al., 2013):

- Plasmaféresis: El recambio de plasma ha sido muy efectivo en pacientes con mutaciones en *CFH* (Licht, et al., 2005) u otras alteraciones (Krmr, et al., 2011). Sin embargo, en una paciente con C3NeF el resultado ha sido limitado (Banks, et al., 1982, McCaughan, et al., 2012).
- Inmunosupresores: Las respuestas de casos clínicos a esta terapia también han sido variadas. A falta de estudios controlados con series de pacientes, en muchos de los casos publicados la terapia parece ineficaz (Bomback, et al., 2012, Daina, et al., 2012, McCaughan, et al., 2012, Pickering, et al., 2013, Rousset-Rouviere, et al., 2014). Sin embargo, hay un estudio realizado con una amplia cohorte de pacientes, en el que el tratamiento con inmunosupresores, en concreto con micofenolato y corticoides, resulta en mejora sustancial de la supervivencia renal (Rabasco, et al., 2015). Además de este estudio, también hay descrita otra serie de pacientes cuya función renal no ha empeorado mientras seguían este tratamiento (Sethi, et al., 2012).
- Terapias anti-complemento: A pesar de que el eculizumab no esté indicado para el tratamiento de C3G, hay varios casos de pacientes que han recibido este tratamiento, y una vez más, las respuestas no han sido homogéneas, indicando por tanto que sólo podrían beneficiarse de este tratamiento un subgrupo de pacientes C3G (Bomback, et al., 2012, Daina, et al., 2012, Gurkan, et al., 2013, McCaughan, et al., 2012, Vivarelli, et al., 2012).

La variabilidad en los mecanismos patogénicos encontrada en esta patología sea la que probablemente explique las diferencias encontradas en la respuesta a los distintos tratamientos. En concreto, la respuesta heterogénea al tratamiento con eculizumab era en cierto modo esperable. El eculizumab es un inhibidor de complemento de la vía lítica, luego pacientes con C3G que presenten altos niveles de sC5b-9 probablemente se beneficien de esta terapia. Sin embargo, aquellos en los que la desregulación ocurre a nivel de la AP C3-convertasa, como los pacientes con mutaciones de ganancia de función en FB o C3, y en los que la contribución de la vía terminal es mínima, el tratamiento con eculizumab no supondrá ninguna mejora. De hecho, en el modelo de DDD del ratón FH KO, la deficiencia conjunta de C5

no corregía el depósito de C3 en el glomérulo (Pickering, et al., 2006). Por lo tanto, antes de iniciar cualquier terapia en C3G, parece necesario hacer un análisis genético y de niveles de complemento para poder así anticipar la respuesta al tratamiento.

Los mAbs anti-C3 que hemos desarrollado en el laboratorio creemos que podrían beneficiar a ese subgrupo de pacientes que no responden al eculizumab ni a otras terapias alternativas. En el ensayo in vitro empleando C3NeFs, los mAbs C3-16.4, C3-12.17 y C3-42.3 mostraron una gran eficacia inhibiendo la activación de C3. En el caso de los mAbs C3-12.17 y C3-42.3, conociendo su sitio de interacción, los mAbs permitirían la formación de la C3-convertasa estabilizada por los C3NeFs pero bloquearían el acceso de C3 a la AP C3-convertasa. Mientras que en el caso del C3-16.4, el mAb bloquearía la formación de la AP C3-convertasa impidiendo por tanto la unión de los C3NeFs. Hubiera sido interesante poder probar estos mAbs en el modelo de DDD del ratón deficiente en FH, pero la baja afinidad de estos anticuerpos por el C3 de ratón lo ha impedido.

No muchas moléculas son capaces de revertir los efectos de los C3NeFs, de hecho sólo hay descrito un anticuerpo capaz de hacerlo, el H17 (Paixao-Cavalcante, et al., 2014). El H17 es un anticuerpo humanizado que reconoce C3b, y que al igual que el C3-16.4, inhibe la interacción entre el FB y el C3b. Además de este anticuerpo, destacan moléculas como compstatin o el sCR1 (Zhang, et al., 2013) y OMS721 (Omeros) que ya han entrado en las primeras fases de ensayos clínicos. La falta de tratamientos específicos para C3G pone en valor la caracterización de los mAbs que se presentan en esta tesis.

El desarrollo de terapias frente a distintas dianas localizadas en diferentes puntos de la cascada de activación de complemento va a permitir que en un futuro cada paciente disponga de una terapia personalizada que se adapte a sus necesidades clínicas. Al iniciar cualquier terapia se deben considerar varios aspectos, y entre ellos destaca la toxicidad o los efectos secundarios que pueden derivar de la administración del fármaco. De la experiencia con pacientes deficientes en proteínas del complemento hoy podemos anticipar cuáles son los riesgos que puede suponer la inhibición con terapias anti-complemento, que son principalmente enfermedades autoinmunes (asociadas principalmente a deficiencias en la vía clásica) y mayor susceptibilidad a infecciones por bacterias encapsuladas, especialmente de la especie *Neisseria* (Figueroa, et al., 1993). Varios estudios han mostrado los beneficios que supone la vacuna frente a esta especie bacteriana en pacientes con deficiencias en complemento (Densen, et al., 1987, Fijen, et al., 1998, Morgan and Orren, 1998). Basándose en esos datos, y tratando de afrontar las posibles complicaciones derivadas de la inhibición de la

vía terminal del complemento, desde que se inició el tratamiento con eculizumab los pacientes han sido vacunados frente a esta especie antes de iniciar el tratamiento, y salvo algún caso aislado, en general se han obtenido buenos resultados (Alashkar, et al., 2017, MacNeil, et al., 2016). Considerando la eficacia que el tratamiento profiláctico ha tenido con el eculizumab, sería recomendable que cualquier otra futura terapia anti-complemento sea acompañada de estos tratamientos preventivos.

En concreto, el desarrollo de terapias dirigidas frente a C3, la molécula central del complemento, ha generado cierta preocupación en este aspecto, ya que se presupone que van a conllevar a un riesgo de infección aun mayor y que también puede causar problemas de autoinmunidad. Es posible que en los próximos años esta cuestión pueda ser resuelta en los ensayos clínicos con compstatin, el péptido inhibidor de la activación de C3 y finalmente se puedan determinar concretamente cuáles son las consecuencias de la inhibición de C3 en un paciente. De cualquier modo, la inhibición a nivel de C3 no tiene siempre que ser sistémica, ni tiene que estar indicada para todas las enfermedades asociadas a desregulación de complemento. En enfermedades como DMAE, la inhibición podría ser a nivel local, sin que ésta produjese perjuicios en la respuesta a infecciones. En enfermedades como SHUa, donde la desregulación de complemento ocurre a nivel de superficies, la inhibición sistémica de C3 no sea probablemente la mejor estrategia a seguir, y se deban considerar otras terapias como los inhibidores de la vía terminal o los reguladores acoplados a moléculas guías del sitio de activación. Sin embargo, en enfermedades como DDD, donde la desregulación de la vía alternativa parece suceder en fase fluida, la inhibición a nivel de C3 parece una terapia muy prometedora, y que puede reportar en grandes beneficios para el paciente. Siguiendo las indicaciones adoptadas para el tratamiento con el eculizumab, parece razonable pensar que una estrecha monitorización del paciente acompañado de un tratamiento profiláctico, sea suficiente para evitar las complicaciones derivadas de la inhibición de C3.

Además de estos tres mAbs con potenciales terapéuticos, también caracterizamos el C3-12.2, anticuerpo que creemos que puede servir como biomarcador para enfermedades asociadas a desregulación de complemento.

El mAb C3-12.2 reconoce específicamente los fragmentos iC3b y C3dg en humanos y en otras especies. Este mAb se une al dominio TED en un neoepítipo localizado en el fragmento C3d, que sólo se expone tras el corte de C3b a iC3b. Este anticuerpo ha mostrado su utilidad en varios ensayos en el laboratorio:

- En ensayos de inmunofluorescencia y citometría es capaz de reconocer los fragmentos de iC3b/C3dg tanto humanos como de ratón depositados sobre superficies. Estos ensayos ponen en evidencia la utilidad de este anticuerpo como biomarcador, tanto en ensayos clínicos como preclínicos, detectando superficies en las que se está activando complemento. Contar con un reactivo que sea capaz de identificar la identidad de los fragmentos de C3 puede ayudar a entender los mecanismos patológicos detrás de la patología (Paixao-Cavalcante, et al., 2009).
- En ensayos de purificación de C3dg: A partir de la activación de suero tanto humano como de ratón con cobra venom factor, fuimos capaces de purificar el C3dg al pasar el suero por una columna de inmutofinidad acoplada a este anticuerpo.

Una de las nuevas estrategias anti-complemento consiste en llevar la terapia al lugar donde el complemento se está activando. Una de estas primeras moléculas es el TT-30 una proteína recombinante formada por la fusión de la región de reconocimiento de CR2 con la región reguladora de FH (Fridkis-Hareli, et al., 2011). Este tipo de abordajes tienen grandes ventajas ya que consiguen regular el complemento únicamente en las superficies donde sea necesario. El mAb C3-12.2, al reconocer específicamente el iC3b/C3dg podría actuar como vehículo para otras terapias. Además, dado que no interfiere con el sitio de reconocimiento de iC3b/C3dg por los receptores de complemento CR1, CR3 o CR4, no esperaríamos que su aplicación tuviera ningún efecto inmunomodulatorio, o que afectase al procesamiento de iC3b por CR1.

Existen numerosos mAbs frente a los fragmentos de C3, pero de entre todos ellos, sólo 11 dicen reconocer iC3b o C3dg. Sin embargo, la caracterización detallada de estos mAbs es muy escasa, y casi ninguno especifica su reactividad cruzada frente a otras especies, o su posible utilidad en los diferentes ensayos WB, ELISA o inmunohistoquímica. En la actualidad sólo hay un pequeño grupo de mAbs bien caracterizados, el mAb anti-mouse C3d A209 (Quidel) y los mAbs anti-iC3b/C3dg descritos por el grupo de Holers (Thurman, et al., 2013).

En conjunto, estos datos ponen en evidencia la falta de buenos reactivos específicos para los fragmentos derivados de la activación de C3. Mediante la caracterización detallada tanto a nivel funcional como estructural del C3-12.2 creemos haber aportado un valioso reactivo con múltiples aplicaciones.

3. Evaluación de la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN.

Durante los últimos años varios estudios han mostrado que la respuesta al tratamiento con eculizumab era heterogénea entre los pacientes HPN, existiendo un grupo de entre un 25-40% de pacientes que seguía mostrando signos de anemia y que requería de transfusiones (Brodsky, et al., 2008, Hillmen, et al., 2006, Luzzatto, et al., 2011). La causa detrás de ello ha generado cierta controversia, y mientras que unos apoyan a la hemólisis extravascular como la razón principal (Hill, et al., 2010), otros lo achacan al bloqueo parcial de C5 y a factores genéticos de predisposición (Peffault de Latour, et al., 2015).

En este contexto, en el laboratorio hemos evaluado la eficacia de este tratamiento en una cohorte de 12 pacientes HPN tratados con eculizumab mediante el estudio de marcadores hemolíticos y biomarcadores de activación de complemento, y hemos tratado de buscar las causas que pudieran predisponer a las diferencias en la respuesta al tratamiento.

Al contrario de lo observado en otros estudios (Brodsky, et al., 2008, Hill, et al., 2010, Hillmen, et al., 2006, Luzzatto, et al., 2011, Rondelli, et al., 2014), en nuestra cohorte de pacientes, a excepción del HPN002, ningún HPN ha requerido de transfusiones sanguíneas a partir de que empezara a recibir el tratamiento con eculizumab. El caso del HPN002 no es llamativo, ya que es la única paciente con anemia aplásica, y posiblemente el fallo en la médula ósea contribuya en buena medida a la anemia observada en este paciente. Además, tanto los niveles de hemoglobina como de LDH, pese a que en muchos casos no se encontraban dentro del rango normal, habían mejorado notoriamente en todos los pacientes respecto al momento de inicio del tratamiento. En conjunto, estos datos mostraban que en nuestra cohorte de HPN, los pacientes estaban respondiendo bien al tratamiento con eculizumab. Sin embargo, algunos marcadores hematológicos como los niveles de bilirrubina o el recuento de reticulocitos, sí que sugerían, coincidiendo resultados previos de otros grupos, que muchos pacientes sufrían una ligera hemólisis.

Las determinaciones tanto del CH50 como de los niveles de C5b-9s y eculizumab libre mostraban que los pacientes tenían completamente inhibida la vía terminal del complemento, indicando por tanto que la hemólisis persistente en estos pacientes no era consecuencia de una dosis insuficiente de eculizumab.

A la vista de la correlación establecida entre los niveles de eculizumab libre, sC5b-9 y CH50, consideramos que puede ser muy útil evaluar estos parámetros en cualquier paciente

con signos de hemólisis al que se le plantee un ajuste en la dosis de eculizumab (Peffault de Latour, et al., 2015, Riddell, et al., 2016). Dicha evaluación podrá ser de gran ayuda sobre todo en aquellos pacientes con anemia aplásica, en los que se desconoce si la causa de la hemólisis pueda ser la dosis de eculizumab o por el contrario el fallo medular. Así mismo, también podría ser oportuno el ajuste de la dosis a la baja de aquellos pacientes que muestren durante todo el ciclo unos niveles muy por encima de los necesarios para bloquear la hemólisis. Por lo tanto, la monitorización de estas determinaciones nos serviría de guía para personalizar la administración del eculizumab, de la que podrán beneficiarse no sólo los pacientes HPN sino también los pacientes con SHUa.

Descartada la activación de C5 como causa de la hemólisis en nuestro pacientes, observamos que los pacientes con un mayor número de eritrocitos HPN opsonizados con C3 eran aquellos que presentaban un % de reticulocitos y unos niveles de bilirrubina más altos, ambos, marcadores hemolíticos característicos de pacientes que padecen hemólisis extravascular.

Coincidiendo con los resultados de Rondelli et al. (Rondelli, et al., 2014), el depósito de C3 en los E-HPN correlacionaba inversamente con los niveles de CR1. Todos los pacientes *CR1-H/CR1-L* eran Coombs-test positivos, presentaban el porcentaje más alto de E-PNH opsonizados y tenían en comparación con los individuos homocigotos *CR1-H*, un mayor recuento de reticulocitos y niveles de bilirrubina en plasma más altos. El CR1 es un regulador que participa tanto en la disociación de la C3-convertasa (Iida and Nussenzweig, 1981) como de cofactor para FI en la inactivación de C3 (Medof and Nussenzweig, 1984), de hecho, es el único cofactor capaz de inactivar el iC3b a C3dg (Ross, et al., 1982). Además desempeña importantes funciones en la eliminación de inmunocomplejos y fagocitosis (Birmingham and Hebert, 2001, Newman, et al., 1985). Por lo tanto, cabría esperar, que los eritrocitos HPN que además de carecer de CD55 tengan niveles bajos de CR1 fueran más propensos a recubrirse de fragmentos de C3, principalmente de C3b e iC3b, que son las principales opsoninas de los macrófagos, explicando por tanto la asociación entre los niveles de CR1 y la susceptibilidad a sufrir hemólisis extravascular.

Los niveles de CR1, además de contribuir a la opsonización con C3 de los eritrocitos de los pacientes tratados con eculizumab, parecía que también estaban asociados al grado de hemólisis antes de comenzar el tratamiento. Al comparar el número de transfusiones recibidas entre pacientes con el mismo tamaño de clon HPN, homocigotas *CR1-H* o *CR1-H/CR1-L*, observamos que los portadores del alelo *CR1-L* habían necesitado de media más transfusiones,

sugiriendo de nuevo que estos pacientes serían más sensibles a la hemólisis y que por tanto tendrían que estar más controlados. Estos datos, sin embargo, no coincidían con las observaciones del estudio de Rondelli et al. (Rondelli, et al., 2014) en el que se afirmaba que el genotipo de *CR1* no afectaba a ningún aspecto clínico previo al comienzo del tratamiento con eculizumab. Atendiendo al papel de *CR1* como regulador de la C3-convertasa, no es sorprendente que aquellos individuos HPN con niveles más bajos de *CR1* sean más propensos a padecer un mayor grado de hemólisis intravascular en ausencia de eculizumab.

Otro aspecto destacable de los pacientes *CR1-H/CR1-L* era que al presentar una mayor activación de complemento sobre la superficie de sus eritrocitos, tenían un consumo elevado de C3 plasmático. Desafortunadamente, no contamos con una cuantificación de los niveles de C3 previa al inicio del tratamiento con eculizumab para poder determinar si ésta era una condición crónica o si por el contrario había surgido como consecuencia del tratamiento. Sin embargo, sí hemos cuantificado los niveles de C3 en la cohorte de pacientes HPN sin tratar. Esta cohorte incluye a 16 pacientes, de los cuales 10 son *CR1-H/CR1-L*, y todos presentaban niveles de C3 dentro del rango normal (128 ± 23 mg/dL). Hay que destacar, que los pacientes HPN *CR1-H/CR1-L* tenían un tamaño de clon de granulocitos HPN mucho menor que el de los pacientes tratados *CR1-H/CR1-L* (1% al 61%; $19 \pm 24\%$ vs 62% al 99%; $88 \pm 17\%$). De estos datos, parece razonable pensar que el consumo de C3 en los individuos portadores del alelo *CR1-L* sea consecuencia del tratamiento con eculizumab.

El hecho de que estos pacientes HPN *CR1-H/CR1-L* presentaran niveles bajos de C3, planteaba la posibilidad de que fueran más propensos a sufrir infecciones que aquellos que son homocigotos *CR1-H*. La respuesta del complemento frente a una infección la dirigen tres mecanismos clave: Por un lado la lisis directa de bacterias gram-negativas a través del MAC, por otro la generación de anafilotoxinas como el C5a que van a atraer a células fagocíticas al lugar de infección, y por último, la opsonización con fragmentos de C3 de patógenos, marcándolos para ser fagocitados por células del sistema inmune con receptores de complemento en su superficie. Los pacientes tratados con eculizumab tienen inhibida la vía terminal del complemento, por lo que la eficacia de su respuesta de complemento frente a una infección recae principalmente en la opsonización, y si estos pacientes tienen además niveles disminuidos de C3, su respuesta entonces podría verse comprometida. Al igual que ocurre con los pacientes con deficiencias primarias en C3, los individuos con deficiencias adquiridas en C3, como consecuencia de deficiencias en FH o FI (E, et al., 2006, Singer, et al., 1994), también son más propensos a padecer infecciones especialmente del tracto respiratorio o meningitis. El número reducido de pacientes HPN *CR1-H/CR1-L* nos impide sacar

conclusiones definitivas, pero es llamativo que los dos únicos pacientes que han tenido que ser hospitalizados debido a infecciones eran *CR1-H/CR1-L* y presentaban niveles bajos de C3. A la espera de un estudio realizado con un número mayor de pacientes que permita profundizar más en este tema, nuestros resultados sugieren que se preste una atención especial a aquellos pacientes tratados con eculizumab portadores del alelo *CR1-L*.

En conclusión, nuestro estudio muestra que los 12 pacientes HPN analizados están respondiendo muy bien al tratamiento con eculizumab, habiendo recuperado prácticamente los niveles de hemoglobina y LDH, y que pese a que la mayoría de los pacientes presenten un alto porcentaje de sus eritrocitos opsonizados con C3, en algunos casos acompañados de un recuento elevado de reticulocitos y niveles altos de bilirrubina, la hemólisis extravascular no parece ser un problema en nuestra cohorte de pacientes, ya que ninguno ha requerido de transfusiones durante su tratamiento con eculizumab.

Sin embargo, varios estudios han detectado que entre un 25-40% (Brodsky, et al., 2008, Hillmen, et al., 2006, Luzzatto, et al., 2011) de los pacientes HPN siguen requiriendo de transfusiones sanguíneas pese a estar tratados con eculizumab, y esta situación la achacan a la hemólisis extravascular causada por el depósito masivo de C3 en los eritrocitos HPN. Quizás el hecho de que en nuestra cohorte no haya ningún paciente homocigoto para el alelo *CR1-L* podría explicar las diferencias entre los datos de hemólisis de nuestra población HPN y los de los otros estudios. A parte de en nuestro trabajo, sólo en el estudio de Rondelli et al. (Rondelli, et al., 2014) se ha analizado el genotipo de CR1 en relación con la respuesta a eculizumab, luego para poder concluir que existe una asociación entre ambos, sería conveniente estudiar series más numerosas de pacientes HPN.

En vista de los resultados aportados por otros estudios de respuesta parcial al tratamiento con eculizumab debido a los efectos de la hemólisis extravascular, parece interesante, que en un futuro, estos pacientes puedan ser tratados con otras terapias anti-complemento alternativas. Para evitar los problemas derivados de la activación de C3, las terapias más indicadas para estos pacientes serían aquellas que inhibiesen el loop de amplificación, ya sea bloqueando C3, FB o FD. Estas terapias podrían ser además de gran utilidad para aquellos pacientes con el polimorfismo en C5 asociado a baja respuesta del eculizumab (Nishimura, et al., 2014). Otra alternativa para evitar la hemólisis extravascular podría ser acompañar el eculizumab con reguladores de complemento acoplados a moléculas que los dirijan a las superficies de activación, como receptores de complemento o anticuerpos anti-C3b/iC3b/C3dg.

Conclusiones

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a proteínas del complemento con potenciales aplicaciones en terapia y diagnóstico

- Se ha generado una colección de anticuerpos monoclonales frente a C3 y FB capaces de inhibir la activación del complemento al bloquear el loop de amplificación de la vía alternativa, ya sea impidiendo la formación de la AP C3-convertasa (FB28.4.2 y C3-16.4) o bloqueando la unión de la AP-C3 convertasa a su sustrato, C3 (C3-42.3 y C3-12.17).
- Los resultados obtenidos en los modelos in vitro de SHUa, HPN y DDD realizados con estos mAbs demuestran su eficiencia en el bloqueo de la activación del complemento, sugiriendo que tras su humanización, estos mAbs podrían servir como agentes terapéuticos para tratar aquellas enfermedades asociadas con la desregulación del complemento.
- Los resultados del ensayo in vivo de miastenia gravis con el FB28.4.2 demuestran que la inhibición de la vía alternativa es una estrategia muy eficaz para modular la respuesta del complemento, independientemente de cuál haya sido el disparador de la misma.
- El C3-12.2 es un mAb que reconoce específicamente un neoepítipo en los fragmentos iC3b/C3dg, y que ha resultado ser muy útil en la detección de superficies opsonizadas con fragmentos de C3, pudiendo ser empleado como biomarcador de activación de complemento tanto en humanos como en otras especies.
- El mecanismo molecular de inhibición de los mAbs C3-42.3 y C3-12.17 apoya la implicación de los dominios MG4 y MG5 de C3 en la interacción entre la AP C3-convertasa y C3.

Evaluación de la eficacia del tratamiento con eculizumab en pacientes HPN

- Muchos de los pacientes HPN tratados con eculizumab presentan marcadores hematológicos que sugieren una ligera hemólisis, aunque ésta no tiene ninguna manifestación clínica en los pacientes, ya que excepto el paciente HPN con aplasia, ninguno ha requerido de transfusiones sanguíneas durante el tratamiento.
- Las determinaciones de los niveles de sC5b-9, eculizumab libre y la actividad CH50 indican que el C5 en estos pacientes está completamente bloqueado.
- Hemos puesto a punto un procedimiento que nos permite evaluar los niveles de eculizumab y la inhibición del complemento en el plasma de los pacientes HPN. La monitorización de estos marcadores en los pacientes es una herramienta muy útil para la personalización de la dosis de eculizumab.
- La correlación positiva entre el depósito de C3 en los eritrocitos HPN y los marcadores hematológicos niveles de bilirrubina y recuento de reticulocitos sugiere que algunos de los pacientes HPN tratados con eculizumab sufren hemólisis extravascular.
- El genotipo en *CR1* determina la opsonización con C3 de los eritrocitos HPN, siendo los individuos portadores del alelo *CR1-L* más susceptibles de padecer hemólisis extravascular. La continua activación de la AP en estos individuos puede resultar en un consumo de C3, haciéndolos más vulnerables a padecer infecciones, por lo que recomendamos un mayor seguimiento en estos pacientes.

Bibliografía

- Alashkar, F., Vance, C., Herich-Terhurne, D., Preising, N., Duhrsen, U., Roth, A. 2017. Serologic response to meningococcal vaccination in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) chronically treated with the terminal complement inhibitor eculizumab. *Ann Hematol.*96,589-596.
- Alcorlo, M., Lopez-Perrote, A., Delgado, S., Yebenes, H., Subias, M., Rodriguez-Gallego, C., Rodriguez de Cordoba, S., Llorca, O. 2015. Structural insights on complement activation. *Febs j.*282,3883-3891.
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J.D., Huber-Lang, M. 2008. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.*632,71-79.
- Banks, R.A., May, S., Wallington, T. 1982. Acute renal failure in dense deposit disease: recovery after plasmapheresis. *Br Med J (Clin Res Ed).*284,1874-1875.
- Banz, Y., Hess, O.M., Robson, S.C., Csizmadia, E., Mettler, D., Meier, P., Haeberli, A., Shaw, S., Smith, R.A., Rieben, R. 2007. Attenuation of myocardial reperfusion injury in pigs by Mirococept, a membrane-targeted complement inhibitor derived from human CR1. *Cardiovasc Res.*76,482-493.
- Berends, E.T., Gorham, R.D., Jr., Ruyken, M., Soppe, J.A., Orhan, H., Aerts, P.C., de Haas, C.J., Gros, P., Rooijackers, S.H. 2015. Molecular insights into the surface-specific arrangement of complement C5 convertase enzymes. *BMC Biol.*13,93.
- Birmingham, D.J., Hebert, L.A. 2001. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunol Rev.*180,100-111.
- Bomback, A.S., Smith, R.J., Barile, G.R., Zhang, Y., Heher, E.C., Herlitz, L., Stokes, M.B., Markowitz, G.S., D'Agati, V.D., Canetta, P.A., Radhakrishnan, J., Appel, G.B. 2012. Eculizumab for dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.*7,748-756.
- Brodsky, R.A., Young, N.S., Antonioli, E., Risitano, A.M., Schrezenmeier, H., Schubert, J., Gaya, A., Coyle, L., de Castro, C., Fu, C.L., Maciejewski, J.P., Bessler, M., Kroon, H.A., Rother, R.P., Hillmen, P. 2008. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.*111,1840-1847.
- Cocchio, C., Marzella, N. 2009. Cinryze, a human plasma-derived c1 esterase inhibitor for prophylaxis of hereditary angioedema. *P t.*34,293-328.
- Cook, H.T., Pickering, M.C. 2015. Histopathology of MPGN and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol.*11,14-22.
- Daina, E., Noris, M., Remuzzi, G. 2012. Eculizumab in a patient with dense-deposit disease. *N Engl J Med.*366,1161-1163.
- De Baets, M., Stassen, M.H. 2002. The role of antibodies in myasthenia gravis. *J Neurol Sci.*202,5-11.
- de Cordoba, S.R. 2016. Complement genetics and susceptibility to inflammatory disease. Lessons from genotype-phenotype correlations. *Immunobiology.*221,709-714.
- Densen, P., Weiler, J.M., Griffiss, J.M., Hoffmann, L.G. 1987. Familial properdin deficiency and fatal meningococcemia. Correction of the bactericidal defect by vaccination. *N Engl J Med.*316,922-926.
- E, S.R., Falcao, D.A., Isaac, L. 2006. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol.*63,155-168.
- Erdei, A., Sandor, N., Macsik-Valent, B., Lukacsi, S., Kremlitzka, M., Bajtay, Z. 2016. The versatile functions of complement C3-derived ligands. *Immunol Rev.*274,127-140.
- Fearon, D.T., Austen, K.F. 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.*142,856-863.

- Figueroa, J., Andreoni, J., Densen, P. 1993. Complement deficiency states and meningococcal disease. *Immunol Res.*12,295-311.
- Fijen, C.A., Kuijper, E.J., Drogari-Apiranthitou, M., Van Leeuwen, Y., Daha, M.R., Dankert, J. 1998. Protection against meningococcal serogroup ACYW disease in complement-deficient individuals vaccinated with the tetravalent meningococcal capsular polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol.*114,362-369.
- Forneris, F., Ricklin, D., Wu, J., Tzekou, A., Wallace, R.S., Lambris, J.D., Gros, P. 2010. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science.*330,1816-1820.
- Fridkis-Hareli, M., Storek, M., Mazsaroff, I., Risitano, A.M., Lundberg, A.S., Horvath, C.J., Holers, V.M. 2011. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood.*118,4705-4713.
- Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J., Skjoedt, M.O. 2016. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev.*274,74-97.
- Geffre, A., Concordet, D., Braun, J.P., Trumel, C. 2011. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.*40,107-112.
- Gorham, R.D., Jr., Nunez, V., Lin, J.H., Rooijackers, S.H., Vullev, V.I., Morikis, D. 2015. Discovery of Small Molecules for Fluorescent Detection of Complement Activation Product C3d. *J Med Chem.*58,9535-9545.
- Gurkan, S., Fyfe, B., Weiss, L., Xiao, X., Zhang, Y., Smith, R.J. 2013. Eculizumab and recurrent C3 glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol.*28,1975-1981.
- Hajishengallis, G., Lambris, J.D. 2010. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol.*31,154-163.
- Ham, T.H., Dingle, J.H. 1939. STUDIES ON DESTRUCTION OF RED BLOOD CELLS. II. CHRONIC HEMOLYTIC ANEMIA WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA: CERTAIN IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF THE HEMOLYTIC MECHANISM WITH SPECIAL REFERENCE TO SERUM COMPLEMENT. *J Clin Invest.*18,657-672.
- Harboe, M., Ulvund, G., Vien, L., Fung, M., Mollnes, T.E. 2004. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol.*138,439-446.
- Harboe, M., Garred, P., Karlstrom, E., Lindstad, J.K., Stahl, G.L., Mollnes, T.E. 2009. The downstream effects of mannan-induced lectin complement pathway activation depend quantitatively on alternative pathway amplification. *Mol Immunol.*47,373-380.
- Hill, A., Rother, R.P., Arnold, L., Kelly, R., Cullen, M.J., Richards, S.J., Hillmen, P. 2010. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica.*95,567-573.
- Hillmen, P., Hall, C., Marsh, J.C., Elebute, M., Bombara, M.P., Petro, B.E., Cullen, M.J., Richards, S.J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Rother, R.P. 2004. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.*350,552-559.
- Hillmen, P., Muus, P., Duhrsen, U., Risitano, A.M., Schubert, J., Luzzatto, L., Schrezenmeier, H., Szer, J., Brodsky, R.A., Hill, A., Socie, G., Bessler, M., Rollins, S.A., Bell, L., Rother, R.P., Young, N.S. 2007. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.*110,4123-4128.
- Hillmen, P., Young, N.S., Schubert, J., Brodsky, R.A., Socie, G., Muus, P., Roth, A., Szer, J., Elebute, M.O., Nakamura, R., Browne, P., Risitano, A.M., Hill, A., Schrezenmeier, H., Fu, C.L., Maciejewski, J., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Rother, R.P., Luzzatto, L. 2006. The

- complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.*355,1233-1243.
- Holers, V.M. 2008. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev.*223,300-316.
- Huda, R., Tuzun, E., Christadoss, P. 2014. Targeting complement system to treat myasthenia gravis. *Rev Neurosci.*25,575-583.
- Hughes, B.W., Moro De Casillas, M.L., Kaminski, H.J. 2004. Pathophysiology of myasthenia gravis. *Semin Neurol.*24,21-30.
- Iida, K., Nussenzweig, V. 1981. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J Exp Med.*153,1138-1150.
- Jaffe, C.J., Atkinson, J.P., Frank, M.M. 1976. The role of complement in the clearance of cold agglutinin-sensitized erythrocytes in man. *J Clin Invest.*58,942-949.
- Janssen, B.J., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J.D., Gros, P. 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature.*444,213-216.
- Janssen, B.J., Huizinga, E.G., Raaijmakers, H.C., Roos, A., Daha, M.R., Nilsson-Ekdahl, K., Nilsson, B., Gros, P. 2005. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature.*437,505-511.
- Janssen, B.J., Gomes, L., Koning, R.I., Svergun, D.I., Koster, A.J., Fritzing, D.C., Vogel, C.W., Gros, P. 2009. Insights into complement convertase formation based on the structure of the factor B-cobra venom factor complex. *Embo j.*28,2469-2478.
- Jozsi, M., Tortajada, A., Uzonyi, B., Goicoechea de Jorge, E., Rodriguez de Cordoba, S. 2015. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol.*36,374-384.
- Katschke, K.J., Jr., Wu, P., Ganesan, R., Kelley, R.F., Mathieu, M.A., Hass, P.E., Murray, J., Kirchhofer, D., Wiesmann, C., van Lookeren Campagne, M. 2012. Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the factor D exosite. *J Biol Chem.*287,12886-12892.
- Kelly, R.J., Hill, A., Arnold, L.M., Brooksbank, G.L., Richards, S.J., Cullen, M., Mitchell, L.D., Cohen, D.R., Gregory, W.M., Hillmen, P. 2011. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood.*117,6786-6792.
- Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.O., Ager, R.R., Reis, E.S., Kohl, J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol.*46,2753-2766.
- Kolev, M., Le Friec, G., Kemper, C. 2014. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.*14,811-820.
- Krmar, R.T., Holtback, U., Linne, T., Berg, U.B., Celsi, G., Soderberg, M.P., Wernerson, A., Szakos, A., Larsson, S., Skattum, L., Barany, P. 2011. Acute renal failure in dense deposit disease: complete recovery after combination therapy with immunosuppressant and plasma exchange. *Clin Nephrol.*75 Suppl 1,4-10.
- Lachmann, P.J. 2009. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol.*104,115-149.
- Laursen, N.S., Andersen, K.R., Braren, I., Spillner, E., Sottrup-Jensen, L., Andersen, G.R. 2011. a. *Embo j.*30,606-616.
- Licht, C., Weyersberg, A., Heinen, S., Stapenhorst, L., Devenge, J., Beck, B., Waldherr, R., Kirschfink, M., Zipfel, P.F., Hoppe, B. 2005. Successful plasma therapy for atypical hemolytic uremic syndrome caused by factor H deficiency owing to a novel mutation in the complement cofactor protein domain 15. *Am J Kidney Dis.*45,415-421.
- Licht, C., Greenbaum, L.A., Muus, P., Babu, S., Bedrosian, C.L., Cohen, D.J., Delmas, Y., Douglas, K., Furman, R.R., Gaber, O.A., Goodship, T., Herthelius, M., Hourmant, M., Legendre, C.M., Remuzzi, G., Sheerin, N., Trivelli, A., Loirat, C. 2015. Efficacy and safety of

- eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome from 2-year extensions of phase 2 studies. *Kidney Int.*87,1061-1073.
- Lin, Z., Schmidt, C.Q., Koutsogiannaki, S., Ricci, P., Risitano, A.M., Lambris, J.D., Ricklin, D. 2015. Complement C3dg-mediated erythrophagocytosis: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.*126,891-894.
- Lintner, K.E., Wu, Y.L., Yang, Y., Spencer, C.H., Hauptmann, G., Hebert, L.A., Atkinson, J.P., Yu, C.Y. 2016. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol.*7,36.
- Logue, G.L., Rosse, W.F., Adams, J.P. 1973. Mechanisms of immune lysis of red blood cells in vitro. I. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *J Clin Invest.*52,1129-1137.
- Luzzatto, L., Gianfaldoni, G., Notaro, R. 2011. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. *Br J Haematol.*153,709-720.
- MacNeil, J.R., Rubin, L.G., Patton, M., Ortega-Sanchez, I.R., Martin, S.W. 2016. Recommendations for Use of Meningococcal Conjugate Vaccines in HIV-Infected Persons - Advisory Committee on Immunization Practices, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*65,1189-1194.
- Martinez-Barricarte, R., Heurich, M., Valdes-Canedo, F., Vazquez-Martul, E., Torreira, E., Montes, T., Tortajada, A., Pinto, S., Lopez-Trascasa, M., Morgan, B.P., Llorca, O., Harris, C.L., Rodriguez de Cordoba, S. 2010. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest.*120,3702-3712.
- Mastellos, D.C., Yancopoulou, D., Kokkinos, P., Huber-Lang, M., Hajishengallis, G., Biglarnia, A.R., Lupu, F., Nilsson, B., Risitano, A.M., Ricklin, D., Lambris, J.D. 2015. Compstatin: a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. *Eur J Clin Invest.*45,423-440.
- Mathern, D.R., Heeger, P.S. 2015. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol.*10,1636-1650.
- McCaughan, J.A., O'Rourke, D.M., Courtney, A.E. 2012. Recurrent dense deposit disease after renal transplantation: an emerging role for complementary therapies. *Am J Transplant.*12,1046-1051.
- Medjeral-Thomas, N., Malik, T.H., Patel, M.P., Toth, T., Cook, H.T., Tomson, C., Pickering, M.C. 2014. A novel CFHR5 fusion protein causes C3 glomerulopathy in a family without Cypriot ancestry. *Kidney Int.*85,933-937.
- Medof, M.E., Nussenzweig, V. 1984. Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1. *J Exp Med.*159,1669-1685.
- Miyata, T., Takeda, J., Iida, Y., Yamada, N., Inoue, N., Takahashi, M., Maeda, K., Kitani, T., Kinoshita, T. 1993. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science.*259,1318-1320.
- Mollnes, T.E., Lea, T., Mellbye, O.J., Pahle, J., Grand, O., Harboe, M. 1986. Complement activation in rheumatoid arthritis evaluated by C3dg and the terminal complement complex. *Arthritis Rheum.*29,715-721.
- Montes, T., Tortajada, A., Morgan, B.P., Rodriguez de Cordoba, S., Harris, C.L. 2009. Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106,4366-4371.
- Morgan, B.P. 2016. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology.*221,747-751.
- Morgan, B.P., Gasque, P. 1997. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol.*107,1-7.
- Morgan, B.P., Orren, A. 1998. Vaccination against meningococcus in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol.*114,327-329.
- Morgan, B.P., Harris, C.L. 2015. Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.*14,857-877.

- Morigi, M., Galbusera, M., Gastoldi, S., Locatelli, M., Buelli, S., Pezzotta, A., Pagani, C., Noris, M., Gobbi, M., Stravalaci, M., Rottoli, D., Tedesco, F., Remuzzi, G., Zoja, C. 2011. Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J Immunol.*187,172-180.
- Nayak, A., Pednekar, L., Reid, K.B., Kishore, U. 2012. Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule. *Innate Immun.*18,350-363.
- Nester, C.M., Smith, R.J. 2013. Treatment options for C3 glomerulopathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*22,231-237.
- Newman, S.L., Becker, S., Halme, J. 1985. Phagocytosis by receptors for C3b (CR1), iC3b (CR3), and IgG (Fc) on human peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.*38,267-278.
- Nishimura, J., Yamamoto, M., Hayashi, S., Ohyashiki, K., Ando, K., Brodsky, A.L., Noji, H., Kitamura, K., Eto, T., Takahashi, T., Masuko, M., Matsumoto, T., Wano, Y., Shichishima, T., Shibayama, H., Hase, M., Li, L., Johnson, K., Lazarowski, A., Tamburini, P., Inazawa, J., Kinoshita, T., Kanakura, Y. 2014. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med.*370,632-639.
- Nonaka, M. 2014. Evolution of the complement system. *Subcell Biochem.*80,31-43.
- Noris, M., Galbusera, M., Gastoldi, S., Macor, P., Banterla, F., Bresin, E., Tripodo, C., Bettoni, S., Donadelli, R., Valoti, E., Tedesco, F., Amore, A., Coppo, R., Ruggenenti, P., Gotti, E., Remuzzi, G. 2014. Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood.*124,1715-1726.
- Paixao-Cavalcante, D., Hanson, S., Botto, M., Cook, H.T., Pickering, M.C. 2009. Factor H facilitates the clearance of GBM bound iC3b by controlling C3 activation in fluid phase. *Mol Immunol.*46,1942-1950.
- Paixao-Cavalcante, D., Torreira, E., Lindorfer, M.A., Rodriguez de Cordoba, S., Morgan, B.P., Taylor, R.P., Llorca, O., Harris, C.L. 2014. A humanized antibody that regulates the alternative pathway convertase: potential for therapy of renal disease associated with nephritic factors. *J Immunol.*192,4844-4851.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., Muller-Eberhard, H.J. 1981. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.*154,856-867.
- Pascual, M., Steiger, G., Estreicher, J., Macon, K., Volanakis, J.E., Schifferli, J.A. 1988. Metabolism of complement factor D in renal failure. *Kidney Int.*34,529-536.
- Peffault de Latour, R., Fremeaux-Bacchi, V., Porcher, R., Xhaard, A., Rosain, J., Castaneda, D.C., Vieira-Martins, P., Roncelin, S., Rodriguez-Otero, P., Plessier, A., Sicre de Fontbrune, F., Abbes, S., Robin, M., Socie, G. 2015. Assessing complement blockade in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Blood.*125,775-783.
- Pickering, M.C., Cook, H.T., Warren, J., Bygrave, A.E., Moss, J., Walport, M.J., Botto, M. 2002. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat Genet.*31,424-428.
- Pickering, M.C., Warren, J., Rose, K.L., Carlucci, F., Wang, Y., Walport, M.J., Cook, H.T., Botto, M. 2006. Prevention of C5 activation ameliorates spontaneous and experimental glomerulonephritis in factor H-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*103,9649-9654.
- Pickering, M.C., D'Agati, V.D., Nester, C.M., Smith, R.J., Haas, M., Appel, G.B., Alpers, C.E., Bajema, I.M., Bedrosian, C., Braun, M., Doyle, M., Fakhouri, F., Fervenza, F.C., Fogo, A.B., Fremeaux-Bacchi, V., Gale, D.P., Goicoechea de Jorge, E., Griffin, G., Harris, C.L., Holers, V.M., Johnson, S., Lavin, P.J., Medjeral-Thomas, N., Paul Morgan, B., Nast, C.C., Noel, L.H., Peters, D.K., Rodriguez de Cordoba, S., Servais, A., Sethi, S., Song, W.C., Tamburini, P., Thurman, J.M., Zavros, M., Cook, H.T. 2013. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int.*84,1079-1089.

- Piddlesden, S.J., Jiang, S., Levin, J.L., Vincent, A., Morgan, B.P. 1996. Soluble complement receptor 1 (sCR1) protects against experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.*71,173-177.
- Rabasco, C., Caverio, T., Roman, E., Rojas-Rivera, J., Olea, T., Espinosa, M., Cabello, V., Fernandez-Juarez, G., Gonzalez, F., Avila, A., Baltar, J.M., Diaz, M., Alegre, R., Elias, S., Anton, M., Frutos, M.A., Pobes, A., Blasco, M., Martin, F., Bernis, C., Macias, M., Barroso, S., de Lorenzo, A., Ariceta, G., Lopez-Mendoza, M., Rivas, B., Lopez-Revuelta, K., Campistol, J.M., Mendizabal, S., de Cordoba, S.R., Praga, M. 2015. Effectiveness of mycophenolate mofetil in C3 glomerulonephritis. *Kidney Int.*88,1153-1160.
- Ricklin, D., Lambris, J.D. 2016. New milestones ahead in complement-targeted therapy. *Semin Immunol.*28,208-222.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J.D. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.*11,785-797.
- Riddell, A., Goodship, T., Bingham, C. 2016. Prevention of recurrence of atypical hemolytic uremic syndrome post renal transplant with the use of higher-dose eculizumab. *Clin Nephrol.*86,200-202.
- Riedl, M.A., Bernstein, J.A., Li, H., Reshef, A., Lumry, W., Moldovan, D., Farkas, H., Levy, R., Baker, J., Hardiman, Y., Totoritis, M.C., Relan, A., Cicardi, M. 2014. Recombinant human C1-esterase inhibitor relieves symptoms of hereditary angioedema attacks: phase 3, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol.*112,163-169.e161.
- Risitano, A.M. 2012. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology.*217,1080-1087.
- Risitano, A.M., Notaro, R., Pascariello, C., Sica, M., del Vecchio, L., Horvath, C.J., Fridkis-Hareli, M., Selleri, C., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., Luzzatto, L., Holers, V.M. 2012. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood.*119,6307-6316.
- Risitano, A.M., Notaro, R., Marando, L., Serio, B., Ranaldi, D., Seneca, E., Ricci, P., Alfinito, F., Camera, A., Gianfaldoni, G., Amendola, A., Boschetti, C., Di Bona, E., Fratellanza, G., Barbano, F., Rodeghiero, F., Zanella, A., Iori, A.P., Selleri, C., Luzzatto, L., Rotoli, B. 2009. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood.*113,4094-4100.
- Rodriguez de Cordoba, S., Harris, C.L., Morgan, B.P., Llorca, O. 2011. Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta.*1812,12-22.
- Rodriguez de Cordoba, S., Hidalgo, M.S., Pinto, S., Tortajada, A. 2014. Genetics of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Semin Thromb Hemost.*40,422-430.
- Rondelli, T., Risitano, A.M., Peffault de Latour, R., Sica, M., Peruzzi, B., Ricci, P., Barcellini, W., Iori, A.P., Boschetti, C., Valle, V., Fremeaux-Bacchi, V., De Angioletti, M., Socie, G., Luzzatto, L., Notaro, R. 2014. Polymorphism of the complement receptor 1 gene correlates with the hematologic response to eculizumab in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica.*99,262-266.
- Rooijackers, S.H., Wu, J., Ruyken, M., van Domselaar, R., Planken, K.L., Tzekou, A., Ricklin, D., Lambris, J.D., Janssen, B.J., van Strijp, J.A., Gros, P. 2009. Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat Immunol.*10,721-727.
- Ross, G.D., Lambris, J.D. 1982. Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. *J Exp Med.*155,96-110.

- Ross, G.D., Lambris, J.D., Cain, J.A., Newman, S.L. 1982. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol.*129,2051-2060.
- Rother, R.P., Rollins, S.A., Mojciak, C.F., Brodsky, R.A., Bell, L. 2007. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol.*25,1256-1264.
- Rousset-Rouviere, C., Cailliez, M., Garaix, F., Bruno, D., Laurent, D., Tsimaratos, M. 2014. Rituximab fails where eculizumab restores renal function in C3nef-related DDD. *Pediatr Nephrol.*29,1107-1111.
- Ruseva, M.M., Vernon, K.A., Leshner, A.M., Schwaebler, W.J., Ali, Y.M., Botto, M., Cook, T., Song, W., Stover, C.M., Pickering, M.C. 2013. Loss of properdin exacerbates C3 glomerulopathy resulting from factor H deficiency. *J Am Soc Nephrol.*24,43-52.
- Sanchez-Corral, P., Gonzalez-Rubio, C., Rodriguez de Cordoba, S., Lopez-Trascasa, M. 2004. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol.*41,81-84.
- Sargsyan, S.A., Serkova, N.J., Renner, B., Hasebroock, K.M., Larsen, B., Stoldt, C., McFann, K., Pickering, M.C., Thurman, J.M. 2012. Detection of glomerular complement C3 fragments by magnetic resonance imaging in murine lupus nephritis. *Kidney Int.*81,152-159.
- Schmidt, C.Q., Lambris, J.D., Ricklin, D. 2016. Protection of host cells by complement regulators. *Immunol Rev.*274,152-171.
- Schmidt, C.Q., Bai, H., Lin, Z., Risitano, A.M., Barlow, P.N., Ricklin, D., Lambris, J.D. 2013. Rational engineering of a minimized immune inhibitor with unique triple-targeting properties. *J Immunol.*190,5712-5721.
- Schulze, M., Pruchno, C.J., Burns, M., Baker, P.J., Johnson, R.J., Couser, W.G. 1993. Glomerular C3c localization indicates ongoing immune deposit formation and complement activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol.*142,179-187.
- Serkova, N.J., Renner, B., Larsen, B.A., Stoldt, C.R., Hasebroock, K.M., Bradshaw-Pierce, E.L., Holers, V.M., Thurman, J.M. 2010. Renal inflammation: targeted iron oxide nanoparticles for molecular MR imaging in mice. *Radiology.*255,517-526.
- Servais, A., Noel, L.H., Roumenina, L.T., Le Quintrec, M., Ngo, S., Dragon-Durey, M.A., Macher, M.A., Zuber, J., Karras, A., Provot, F., Moulin, B., Grunfeld, J.P., Niaudet, P., Lesavre, P., Fremeaux-Bacchi, V. 2012. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int.*82,454-464.
- Sethi, S., Fervenza, F.C., Zhang, Y., Zand, L., Vrana, J.A., Nasr, S.H., Theis, J.D., Dogan, A., Smith, R.J. 2012. C3 glomerulonephritis: clinicopathological findings, complement abnormalities, glomerular proteomic profile, treatment, and follow-up. *Kidney Int.*82,465-473.
- Sfyroera, G., Ricklin, D., Reis, E.S., Chen, H., Wu, E.L., Kaznessis, Y.N., Ekdahl, K.N., Nilsson, B., Lambris, J.D. 2015. Rare loss-of-function mutation in complement component C3 provides insight into molecular and pathophysiological determinants of complement activity. *J Immunol.*194,3305-3316.
- Singer, L., Colten, H.R., Wetsel, R.A. 1994. Complement C3 deficiency: human, animal, and experimental models. *Pathobiology.*62,14-28.
- Sissons, J.G., Liebowitch, J., Amos, N., Peters, D.K. 1977. Metabolism of the fifth component of complement, and its relation to metabolism of the third component, in patients with complement activation. *J Clin Invest.*59,704-715.
- Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., Kinoshita, T. 1993. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell.*73,703-711.

- Taube, C., Thurman, J.M., Takeda, K., Joetham, A., Miyahara, N., Carroll, M.C., Dakhama, A., Giclas, P.C., Holers, V.M., Gelfand, E.W. 2006. Factor B of the alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*103,8084-8089.
- Thurman, J.M., Kraus, D.M., Girardi, G., Hourcade, D., Kang, H.J., Royer, P.A., Mitchell, L.M., Giclas, P.C., Salmon, J., Gilkeson, G., Holers, V.M. 2005. A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol Immunol.*42,87-97.
- Thurman, J.M., Kulik, L., Orth, H., Wong, M., Renner, B., Sargsyan, S.A., Mitchell, L.M., Hourcade, D.E., Hannan, J.P., Kovacs, J.M., Coughlin, B., Woodell, A.S., Pickering, M.C., Rohrer, B., Holers, V.M. 2013. Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. *J Clin Invest.*123,2218-2230.
- Torreira, E., Tortajada, A., Montes, T., Rodriguez de Cordoba, S., Llorca, O. 2009. Coexistence of closed and open conformations of complement factor B in the alternative pathway C3bB(Mg²⁺) proconvertase. *J Immunol.*183,7347-7351.
- Torreira, E., Tortajada, A., Montes, T., Rodriguez de Cordoba, S., Llorca, O. 2009. 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106,882-887.
- Tortajada, A., Yebenes, H., Abarrategui-Garrido, C., Anter, J., Garcia-Fernandez, J.M., Martinez-Barricarte, R., Alba-Dominguez, M., Malik, T.H., Bedoya, R., Cabrera Perez, R., Lopez Trascasa, M., Pickering, M.C., Harris, C.L., Sanchez-Corral, P., Llorca, O., Rodriguez de Cordoba, S. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J Clin Invest.*123,2434-2446.
- Trouw, L.A., Blom, A.M., Gasque, P. 2008. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol.*45,1199-1207.
- Tuzun, E., Christadoss, P. 2013. Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev.*12,904-911.
- Tuzun, E., Li, J., Saini, S.S., Yang, H., Christadoss, P. 2007. Pros and cons of treating murine myasthenia gravis with anti-C1q antibody. *J Neuroimmunol.*182,167-176.
- van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C., Brown, E.J. 2007. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.*9,2095-2102.
- Vivarelli, M., Pasini, A., Emma, F. 2012. Eculizumab for the treatment of dense-deposit disease. *N Engl J Med.*366,1163-1165.
- Walport, M.J. 2001. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.*344,1058-1066.
- Walport, M.J. 2001. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.*344,1140-1144.
- Wu, J., Wu, Y.Q., Ricklin, D., Janssen, B.J., Lambris, J.D., Gros, P. 2009. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol.*10,728-733.
- Xiao, X., Pickering, M.C., Smith, R.J. 2014. C3 glomerulopathy: the genetic and clinical findings in dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Semin Thromb Hemost.*40,465-471.
- Yamaguchi, N., Misawa, S., Sato, Y., Nagashima, K., Katayama, K., Sekiguchi, Y., Iwai, Y., Amino, H., Suichi, T., Yokota, T., Nishida, Y., Kohara, N., Hirata, K., Nishiyama, K., Yabe, I., Kaida, K.I., Suzuki, N., Nodera, H., Tsuji, S., Koike, H., Kira, J.I., Hanaoka, H., Kusunoki, S., Kuwabara, S. 2016. A Prospective, Multicenter, Randomized Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Eculizumab in Patients with Guillain-Barre Syndrome (GBS): Protocol of Japanese Eculizumab Trial for GBS (JET-GBS). *JMIR Res Protoc.*5,e210.
- Yehoshua, Z., de Amorim Garcia Filho, C.A., Nunes, R.P., Gregori, G., Penha, F.M., Moshfeghi, A.A., Zhang, K., Sadda, S., Feuer, W., Rosenfeld, P.J. 2014. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology.*121,693-701.

Zhang, Y., Nester, C.M., Holanda, D.G., Marsh, H.C., Hammond, R.A., Thomas, L.J., Meyer, N.C., Hunsicker, L.G., Sethi, S., Smith, R.J. 2013. Soluble CR1 therapy improves complement regulation in C3 glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.*24,1820-1829.

Anexos