



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 217**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/18** (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01) **A01K 67/027** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03763792 .3**  
96 Fecha de presentación : **10.07.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1529063**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54 Título: **Anticuerpos anti componente C5 del sistema de complemento y su uso.**

30 Prioridad: **11.07.2002 IT MI02A1527**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.09.2011**

73 Titular/es: **ADIENNE S.R.L.**  
**Via Broseta 64/B**  
**24128 Bergamo, IT**

72 Inventor/es: **Tedesco, Francesco y**  
**Marzari, Roberto**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 217 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti componente c5 del sistema de complemento y su uso.

**Campo de la invención y antecedentes de la técnica**

- 5 La activación del sistema de complemento (sistema C) representa un mecanismo importante en la defensa inmune. Al mismo tiempo representa un arma de doble filo debido a que por un lado garantiza la protección del huésped pero por el otro es capaz de dañar tejidos cuando se activa el complemento por varias circunstancias patológicas. La susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas y trastornos autoinmunes observada en los pacientes con deficiencias heredadas del sistema C claramente demuestra la importancia particular de este sistema en la protección del huésped frente a agentes infecciosos y en la eliminación de inmunocomplejos. Estas funciones protectoras resultan de la activación del complemento en tipo cascada que genera productos biológicamente activos. Algunos de ellos, tales como C1q, C3b y C3bi, opsonizan los agentes infecciosos permitiendo su evacuación. En su lugar otros, tales como C5a y C5b67, tienen la función de reclutar células fagocíticas en el sitio de inflamación o lisar dianas sensibles como en el caso del complejo de ataque a membrana (MAC). Desafortunadamente estas moléculas, una vez que se producen, no son capaces de diferenciar entre dianas endógenas y exógenas y provocarían daño grave a tejidos y células si estos no estuvieran protegidos por potentes inhibidores de membrana o extracelulares que actúan a diversos niveles en la cascada de activación del complemento. Sin embargo, la acción de los inhibidores se ve sobrepasada en presencia de una activación masiva del sistema C, en enfermedades infecciosas graves o trastornos auto inmunes y el complemento activado provoca destrucción tisular y celular.
- 10 El fragmento C5a y el complejo terminal C (TCC) están entre los productos implicados en la destrucción tisular en varios procesos inflamatorios. Pueden encontrarse estos productos de activación a niveles por encima de lo normal en fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y en fluido cerebroespinal de pacientes con varias enfermedades del sistema nervioso central. También se han hallado niveles elevados de C5a en pacientes con politraumatismos así como en pacientes con lesiones de isquemia miocárdica y reperfusión.
- 15 Por tanto ahora se reconoce el papel de C5a en el desarrollo de estas enfermedades. Esto se demuestra por las señales de estrés pulmonar, hipotensión y leucopenia mostradas por animales que han recibido inyección intravenosa de esta anafilatoxina. Además la instilación bronquial de C5a es capaz de inducir reacciones inflamatorias fuertes en pulmón de conejo.
- 20 TCC se genera a partir del fragmento C5b liberado por escisión enzimática de C5 por la acción de C5 convertasa. Recientemente se ha demostrado que TCC induce inflamación debido al daño tisular derivado de su actividad lítica y de numerosos efectos no citotóxicos sobre fagocitos y otros tipos celulares.
- 25 TCC se ha identificado en varios tejidos en diversas afecciones patológicas, incluyendo artritis reumatoide, glomerulopatía, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas desmielinizantes, aterosclerosis e infarto de miocardio. El desarrollo de modelos animales experimentales de estas enfermedades con deficiencias selectivas en componentes C tardíos ha contribuido adicionalmente a definir el papel de estos componentes en el desarrollo de daño tisular.
- 30 Debido al papel fundamental desempeñado por C5a y TCC en promover la inflamación crónica y el daño tisular, se han realizado varios intentos para neutralizar los componentes tardíos del complejo C como estrategia terapéutica para prevenir estas complicaciones en enfermedades asociadas con activación de C5. Esta molécula resulta ser un diana terapéutica ideal, puesto que su neutralización inhibe la secuencia tardía de acontecimientos de activación de la cascada, sin interferir con la actividad opsonizadora de los componentes tempranos de esta cascada. Anticuerpos monoclonales de ratón específicos para C5 humano, de ratón y de rata y capaces de inhibir la producción de C5a y del complejo de ataque a membrana (MAC) ya están disponibles en el mercado. Los anticuerpos anti-C5 se han usado de forma exitosa en ratones para evitar el desarrollo de artritis inducida por colágeno y para mejorar el ciclo clínico de glomerulonefritis, y en ratas para reducir isquemia miocárdica y reperfusión.
- 35 En los últimos años se han producido dos anticuerpos de cadena sencilla (anticuerpo de cadena sencilla o fragmento variable de cadena sencilla, scFv) ambos de los cuales se describen en la Solicitud de Patente WO 95/29697. Estos anticuerpos son capaces de penetrar tejidos más rápidamente que el anticuerpo completo. El primer anticuerpo de cadena sencilla obtenido por ensamblaje de regiones variables de un anticuerpo de ratón para C5 conserva la capacidad del anticuerpo original de inhibir el ensamblaje del MAC y bloquear parcialmente la producción de C5a (Evans, M. J y col, 1995, Mol. Immunol. 32:1183). Además, este anticuerpo es capaz de prevenir los depósitos de C5b-9 en el corazón con reperfusión de plasma humano o en insuficiencia cardiaca. El segundo scFv es un anticuerpo de ratón humanizado anti-C5 que se obtiene por inserción de regiones CDR murinas (regiones determinantes de complementariedad) en la estructura de la región variable de las cadenas ligera y pesada humanas. Este anticuerpo (Thomas, T. C. y col., 1996, Mol. Immunol. 33:1389) es capaz de inhibir la formación de C5a y C5b-9 aunque el epítipo reconocido mapeado alrededor de los aminoácidos 860-865 de la molécula C5 y correspondiente al péptido KSSKC, resulta estar lejos del sitio de escisión de C5 convertasa. Además estudios posteriores (Fitch, J. C. y col., 1999, Circulation 100:2499) han demostrado que este anticuerpo es capaz de inhibir la actividad hemolítica del complemento, atenuar el daño miocárdico, daño cognitivo y hemorragia postoperatoria en un grupo de pacientes con derivación cardiopulmonar.
- 45
- 50
- 55

El documento WO02/30985 A desvela inhibidores de C5, que inhiben activación de células endoteliales de tipo II, en los que la inhibición se manifiesta por la supresión de E-selectina. Estos inhibidores son útiles en el tratamiento de rechazo de xenotransplantes retardado o rechazo vascular agudo. Los inhibidores incluyen moléculas de anticuerpo, así como homólogos, análogos y formas modificadas o derivadas de los mismos, incluyendo fragmentos de inmunoglobulina tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, moléculas pequeñas, incluyendo péptidos, oligonucleótidos, peptidomiméticos y compuestos orgánicos. Se generaron ejemplos de anticuerpos monoclonales que se unen e inhiben C5, y se designan MAb 137-76 y MAb 137-30. El documento no especifica el sitio de unión a anticuerpo.

### Sumario

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1. Por lo tanto, el principal aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo de origen humano específico para el componente C5 de complemento activado y caracterizado por el hecho de que inhibe la escisión de la cadena alfa de C5 en C5a y C5b. En particular, el anticuerpo es recombinante y reconoce un epítipo que comprende el sitio proteolítico para la C5 convertasa en la cadena alfa del componente de complemento C5.

De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo recombinante se compone de una cadena sencilla (scFv) que comprende una región variable de la cadena ligera unida covalentemente con una región variable de la cadena pesada y, de acuerdo con un aspecto aún más preferido, se compone de o comprende ambas secuencias de aminoácidos identificadas como SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4 o proteínas que tienen al menos 95% de homología con la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID N°: 6 de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención incluye las secuencias de nucleótidos aisladas que codifican anticuerpos específicos para el componente C5 de complemento activado de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9 y en particular que comprenden SEC ID N°: 5. Un aspecto adicional de la invención se refiere a los vectores que contienen las secuencias anteriormente mencionadas. De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere al uso terapéutico de los anticuerpos reivindicados, proteínas y secuencias de nucleótidos para la preparación de fármacos que previenen y tratan enfermedades que implican activación descontrolada del sistema de complemento, en particular artritis reumatoide, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas desmielinizantes, aterosclerosis.

### Descripción de las figuras

**Figura 1. Evaluación de la capacidad de clones anti-C5 scFv Ts-a12 y Ts-a12/22 para inhibir la formación de fragmento C5a por medio de un ensayo ELISA (panel A) y un ensayo hemolítico (panel B).**  
Panel A) El ensayo ELISA mide la cantidad de fragmento C5a liberado en el sobrenadante después de escisión enzimática de C5, usando anticuerpos anti-C5 como se describe en el ejemplo 6. La incubación de C5 con anticuerpos Ts-a12 y Ts-a12/22 de la invención inhibe la formación del fragmento C5a. se añadieron eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos y revestidos hasta la etapa de complemento C3b (EAC1-3b) a la mezcla de TS-A12 o TS-A12/22 y C5, y la mezcla se incubó adicionalmente durante 30 minutos a 37°C (panel B). Como se muestra en la Figura 1 A y B, los anticuerpos TS-A12 y TS-A12/22 inhiben escisión de C5 por C5 convertasa y por lo tanto inhiben la formación de C5a (Panel A) y de TCC (Panel B).  
Símbolos: - ▲ -: Ts-A12/22; - ■ - scFv no relacionado; - ◇ - TS-A12.

**Figura 2. Inmunotransferencia para identificar la cadena C5 reconocida por scFv TS-A12/22.**  
Las cadenas alfa y beta de c5 se separaron electroforéticamente por medio SDS-PAGE en poliacrilamida al 10% y después se transfirieron a nitrocelulosa. La inmunotransferencia (carriles 1 y 2) se desarrolló con anticuerpo TSA-12/22 y se reveló por incubación con anticuerpo monoclonal anti-SV5 (marcador SV5) seguido de incubación con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina. Carril 1: 100 ng de cadena alfa de C5; carril 2: 100 ng de cadena beta; carril 3: mezcla de las dos cadenas. La inmunotransferencia en el carril 3, usada como un control positivo, se desarrolló con un anticuerpo de cabra anti-C5 humano conjugado con biotina que reconoce las cadenas tanto alfa como beta y se reveló con avidina marcada con fosfatasa alcalina. Puede verse que scFv TSA-12/22 reconoce la cadena alfa de C5 en el carril 1, pero no la cadena beta en el carril 2.

**Figura 3. Inhibición de la unión de C5 y scFv de la invención por el péptido P5A-18 (KDMQLGRLHMKTLTPVSK) que comprende el sitio de escisión de C5 convertasa.**  
Se incubaron mezclas de scFv TSA-12/22 (1 µg/ml) que contenían 200, 400 y 800 ng de péptido P5A-18, con la secuencia KDMQLGRLHMKTLTPVSK, que comprende el sitio de escisión de C5 convertasa o 800 ng de péptido no relacionado CS5, derivado de fibronectina (GEEIQIGHIPREDVDYHLYP SEQ ID N° 16 de la lista de secuencias) o 3,5 µg de fragmento C5a o solución salina (control) como se describe en el ejemplo 8. La unión del anticuerpo, pre-incubado en diferentes condiciones, se evaluó por ensayo inmunoenzimático usando C5 en fase sólida. La inhibición por el péptido P5A-18 de la unión entre scFv de la invención y C5 es dependiente de dosis, variando entre el 45% y 90% para concentraciones de péptido de 200 y 800 ng, respectivamente. Estos valores corresponden a una Ki de 1 µM para el péptido P5A-18. No se observa inhibición usando C5A o el péptido no relacionado.

**Figura 4. Inhibición de actividad hemolítica de C5 por el anticuerpo TS-A12/22.**  
Valores de lectura espectrofotométrica realizada a 412 nm para medir la inhibición de lisis de eritrocitos de oveja revestidos con EAC1-3b, a través de la ruta de activación del complemento clásica (Panel A); o de

eritrocitos de conejo para medir la ruta alternativa de activación del complemento (Panel B). Se mezclaron cantidades crecientes de C5 con 600 ng del anticuerpo scFv de la invención con un scFv no relacionado o con GVBS en el que el scFv de la invención se solubilizó, como se describe en el ejemplo 9. Después de la incubación con suero sin C5, obtenido de un paciente con deficiencia selectiva de este componente de complemento, el porcentaje de hemólisis se midió en comparación con el valor del 100% obtenido por lisis de eritrocitos en un volumen igual de H<sub>2</sub>O destilada y un blanco obtenido por resuspensión de eritrocitos en GBVS. Símbolos: - ◇ -: TS-A12/22; - ■ - scFv no relacionado; - ▲ - GVBS.

**Figura 5. Inhibición de actividad hemolítica de C5 en suero de mamíferos por el anticuerpo TS-A12/22.**

Se realizaron mediciones como se describe en el ejemplo 8 usando sueros de ser humano (panel A), rata (panel B), conejo (panel C), ratón (panel D).

Símbolos: - ▲ -: GVBS TS-A12/22; - ■ - scFv no relacionado; - ◇ - TS-A12/22.

**Figura 6. Inhibición de migración intra-articular de Leucocitos Polimorfonucleares (PMN) por el anticuerpo TS-A12/22 en modelos de rata de artritis inducida por antígeno.**

Se incubaron Leucocitos Polimorfonucleares (PMN), aislados de lavado intra-articular de ratas con artritis inducida por instilación de BSA (mBSA), con anticuerpo TS-A12/22 o con un anticuerpo no relacionado, como se describe en el ejemplo 10. El número de PMN en la articulación tratada con el anticuerpo de la invención aparece drásticamente reducida. Solución salina: control sin artritis inducida; mBSA: artritis inducida por BSA, no tratada; no relacionado: artritis inducida por BSA, tratada con anticuerpo scFv no relacionado; Ts-a12/22: artritis inducida por BSA, tratada con el anticuerpo de la invención.

**Figura 7. Análisis de inmunofluorescencia de membrana sinovial de ratas con artritis inducida por antígeno.**

Se analizaron secciones histológicas de articulaciones de ratas tratadas con inyección intra-articular de solución salina (A), BSA (B), BSA con TS-A12/22 (C) y BSA con el anticuerpo no relacionado (D) por inmunofluorescencia con respecto a la presencia de componentes de complemento C3 y C9, como se describe en el ejemplo 10. Se enfatiza que el tratamiento con TS-A12/22 no afecta a la deposición de C3 sino que reduce significativamente la de C9, confirmando de este modo la inhibición de C5.

**Figura 8.** Representación esquemática de *minicuerpos* preparados a partir de secuencias ScFv incluyendo regiones constantes humana, de ratón y de rata.

**Figura 9.** Inhibición de la ruta de activación del complemento clásica.

Símbolos: - ▲ -: GVBS; - ■ - scFv no relacionado; - ◇ - TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*); - ■ - TS-A12/22 (scFv).

**Figura 10.** Inhibición de migración intra-articular de Leucocitos Polimorfonucleares (PMN) por el anticuerpo TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*) en modelos de rata de artritis inducida por antígeno.

Desde la izquierda: barra 1: control (mBSA); barra 2: mBSA + TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*) inyectado en el momento 0; barra 3: mBSA + TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*) inyectado a las 6 horas de la inducción de artritis.

**Figura 11. Reducción de la hinchazón de las articulaciones.**

El anticuerpo, en forma de *minicuerpo*, se inyectó en el modelo de artritis inducida por mBSA en rata en el momento 0 y 6 días después del tratamiento con BSA. Los valores de porcentaje en la ordenada se han obtenido con respecto al diámetro basal de la articulación antes de la inducción de artritis. Los días se indican en la abscisa.

Desde la izquierda: barra 1: control (mBSA); barra 2: mBSA + TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*) inyectado en el momento 0 desde la inducción de la artritis; barra 3: mBSA + TS-A12/22-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (*minicuerpo*) inyectado a las 6 horas desde la inducción de artritis.

## **Descripción detallada de la invención**

El principal objeto de la presente invención se refiere a un anticuerpo de origen humano de acuerdo con la invención 1, que tiene especificidad para el componente C5 del sistema de complemento y se caracteriza por el hecho de inhibir la escisión de la cadena alfa de C5, también denominada C5 activado, en los fragmentos C5a y C5b. Esta escisión se produce como resultado de la activación del complemento que se produce por mecanismos conocidos.

Después de la activación del Complemento, se produce una C5 convertasa que escinde la cadena alfa del factor C5 generando un fragmento de aproximadamente 70 aminoácidos (aa), conocido como C5a y un fragmento C-terminal de 925 aminoácidos, C5b. Los productos resultantes de la activación de C5, C5a y C5b, están biológicamente activos. En particular, C5a tiene actividad quimiotáctica hacia leucocitos polimorfonucleares y monocitos, mientras que el fragmento C5b contribuye a la formación del complejo de complemento terminal (TCC).

El anticuerpo es recombinante.

El anticuerpo de la invención es de origen humano, es decir deriva completamente de un repertorio de anticuerpos obtenido de linfocitos humanos. Estos anticuerpos tienen regiones tanto complementarias de antígenos (CDR) como flanqueantes de origen humano, a diferencia de los anticuerpos humanizados en los que sólo la flanqueante es de origen humano, mientras que las CDR son de origen murino.

El presente documento, por anticuerpos recombinantes se entiende un anticuerpo compuesto de al menos una región variable derivada de la cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina y producida por medio de técnicas de

ingeniería genética a partir de las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones caracterizadoras del anticuerpo. El anticuerpo recombinante se produce en un organismo huésped que habitualmente es una bacteria, una levadura o una célula eucariota superior (de origen animal o vegetal). La técnica de ingeniería genética permite producir anticuerpos completamente humanos o seleccionar un formato diferente de anticuerpos naturales. Por el contrario, los anticuerpos producidos por la tecnología de hibridoma clásica descrita por Milstein y col., sólo pueden ser de ratón o de rata y tienen el típico formato de forma en Y de anticuerpos de cuatro cadenas. Las cuatro cadenas, idénticas por pares, comprenden una cadena pesada y una ligera, consistiendo cada una en una región constante y variable, como se describe por Rathbum, G. y col. (1989) en «Immunoglobulin genes», Academic Press, Nueva York.

De acuerdo con la reivindicación 1, el anticuerpo recombinante anti-C5 de la invención se caracteriza por el hecho de reconocer un epítipo en la cadena alfa del componente C5, que comprende la región de escisión de C5 convertasa. La especificidad de unión del anticuerpo de la invención por el epítipo que comprende el sitio de escisión para C5 convertasa, que se posiciona entre glicina 733 y arginina 734 de C5 humano de acuerdo con la numeración de la Base de Datos SwissProt para C5 humano (SEC ID P01031), puede verificarse *in vitro*. Por ejemplo, puede verificarse por medio de un ensayo ELISA de competición en C5 que hace uso de un péptido sintético, como por ejemplo el péptido KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (en el que la flecha indica el sitio de escisión proteolítica), correspondiente a la región 727-744 de la proteína humana madura. De acuerdo con este aspecto, el anticuerpo se caracteriza por la capacidad de reconocer una región con al menos 80%, preferentemente al menos 90%, 95% de homología con el péptido KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (correspondiente a la SEC ID N° 15). Más preferentemente reconoce un epítipo de al menos 6-10 de aminoácidos compuesto de 1-5 aminoácidos cadena arriba y 1-5 aminoácidos cadena bajo escindido el enlace peptídico por la enzima C5 convertasa, preferentemente el epítipo es LGRLHM. La región que rodea al sitio de escisión está altamente conservada entre varias especies de mamíferos, por lo tanto el anticuerpo de la invención reconoce con una eficacia de unión muy similar la molécula C5 de rata, ratón, conejo etc. Además el anticuerpo tiene en cada especie animal el mismo efecto de bloquear la conversión de C5 activado en sus fragmentos activos C5a + C5b. El anticuerpo recombinante de la invención está preferentemente en una forma de cadena sencilla (scFv), incluso más preferentemente corresponde a SEC ID N° 6 y comprende la región variable de la cadena ligera unida covalentemente a la región variable de la cadena pesada, directamente o mediante una secuencia de aminoácidos denominada engarce. En el presente documento por scFv se entiende un anticuerpo de cadena polipeptídica sencilla, compuesto de la región variable de la cadena ligera unida a la región variable de la cadena pesada directamente o mediante un engarce sintético. Se conocen en la técnica engarces compuestos de secuencias de aminoácidos no naturales (sintéticos) y se describen por ejemplo en (1999): Combinatorial Chemistry and Technology: Principles, Methods, and application, Marcel Dekker Inc, NY Estados Unidos. El engarce sintético es preferentemente la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 13 de la Lista de Secuencias.

En el anticuerpo scFv de la invención, las cadenas VH y VL están preferentemente en el orden VL-VH desde el extremo N- al C-terminal de la cadena polipeptídica. Este formato, en el que el extremo N-terminal consiste en una cadena VL, confiere gran hidrofilia a la proteína completa expresada como tal y a las proteínas de fusión que comprenden las regiones tanto VL como VH. Además hace posible la inserción cadena arriba o cadena abajo de secuencias peptídicas denominadas "marcador" o "marca", que no alteran las características de unión pero se usan por ejemplo para facilitar la detección inmunológica del anticuerpo o su producción o purificación. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo también puede consistir en el formato (N-C terminal) VH-VL o puede contener solamente una de las dos cadenas variables, preferentemente la cadena VH correspondiente a SEC ID N° 4, también en asociación con diferentes cadenas VL, también independientemente de su especificidad, como por ejemplo seleccionable a través de la interacción de la cadena VH correspondiente a SEC ID N° 4 con "colecciones de repertorios moleculares".

En el anticuerpo de la invención, la cadena VL puede tener una secuencia correspondiente a SEC ID N° 2 que está unida covalentemente a una cadena VH que corresponde a SEC ID N° 4.

De acuerdo con un aspecto de la invención, en el anticuerpo scFv, al menos la cadena VH tiene la especificidad anti-C5 anteriormente indicada y corresponde a SEC ID N° 4 de la Lista de Secuencias o a las variantes isotípicas o mutaciones conservativas de estas secuencias. Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto, la invención comprende todos los polipéptidos que comprenden una región que tiene al menos 95% de homología, preferentemente 98% o 99% de homología con la secuencia de aminoácidos de la región VH, preferentemente VH3 correspondiente a SEC ID N° 4. Una realización particularmente preferida de este scFv está representada por el anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID N° 6, que corresponde a la secuencia 4 y 2 unidas por un péptido de engarce con una secuencia correspondiente a SEC ID N° 14. De acuerdo con una realización particularmente preferida el anticuerpo scFv correspondiente a la SEC ID N° 6, tiene una constante de equilibrio para el antígeno mayor de  $1 \times 10^7$ , preferentemente mayor de  $1 \times 10^8$ .

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo scFv se usa para obtener por ingeniería genética casetes de expresión para anticuerpos recombinantes que comprenden la región constante de cadenas pesadas de inmunoglobulina, preferentemente IgG, incluso más preferentemente de origen humano, de ratón o de rata. Incluso más preferentemente estas construcciones comprenden regiones CH2 y CH3 individualmente o en asociación. Los casetes de expresión preparados de acuerdo con este procedimiento se clonan en vectores de

expresión adecuados que se usan para la transfección de células eucariotas, preferentemente de origen mamífero, como por ejemplo HEK293, CHO, COS-1 BHK, células de mieloma u otras células adecuadas para expresión de estos productos proteínicos. De acuerdo con una realización particularmente preferida, el anticuerpo scFv correspondiente a SEC ID N° 5 se produce de forma recombinante con secuencias CH2 y CH3 de rata. En esta forma, el anticuerpo recombinante dimeriza y un scFv TSA22-12 dimérico representa una realización particularmente preferida de la invención.

En cualquier caso se incluye en este alcance de la presente divulgación la secuencia de aminoácidos obtenidos por mutación de las secuencias contenidas en la Lista de Secuencias adjunta, en tanto que estas mutaciones no alteren la especificidad del anticuerpo anti-C5 descrita. La mutación puede ser "conservativa", cuando se basa en un aminoácido con características químicas o estructurales similares con respecto a polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia o se basa en la naturaleza anfipática de los restos aminoácidos implicados. Por ejemplo grupos de aminoácidos que comparten características similares de polaridad se componen de aminoácidos no polares (hidrófobos) que incluyen alanina, leucina, disoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; aminoácidos no polares o neutros que incluyen: glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; aminoácidos cargados positivamente (básicos) que incluyen: arginina, lisina e histidina; y el grupo de aminoácidos cargados negativamente (ácidos) que comprende: ácido aspártico y ácido glutámico. También pueden producirse mutaciones aleatoriamente, por ejemplo usando ADN polimerasas que se saben que son "propensas a errores". Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención comprende anticuerpos recombinantes como se reivindica generados por mutagénesis de las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 3 y 5 correspondientes a las secuencias que codifican la región VH y para el anticuerpo en la forma scFv. De acuerdo con este aspecto, la invención incluye por lo tanto un procedimiento para generar anticuerpos con especificidad por el componente C5 del complemento activado. Este procedimiento esencialmente incluye el uso de cualquiera de las secuencias SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6 o preferentemente la mutagénesis dirigida o aleatoria de las secuencias de nucleótidos que codifican SEC ID N° 4 y N° 6. Por lo tanto este procedimiento preferentemente incluye mutagénesis de las secuencias de nucleótidos SEC ID N° 3 y SEC ID N° 5.

Dentro del formato preferido del anticuerpo, consistente en regiones variables de cadena ligera o pesada del anticuerpo fusionadas en una cadena de scFv sencilla mediante un engarce proteico, la cadena ligera es más preferentemente la cadena lambda y en particular la cadena Vλ3/V2-14 o la cadena kappa, preferentemente la Vκ4/DPK24. La cadena pesada es la cadena VH3, en particular la VH3/V-48, como se define en la base de datos en el sitio: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html> (índice Vbase). De acuerdo con este aspecto la invención comprende todos los anticuerpos como se reivindican, derivados por mutagénesis de la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena VH o el scFv. Estos anticuerpos se caracterizan por el hecho de que conservan especificidad para el componente C5 del sistema de complemento y de inhibición de la escisión de la cadena alfa de C5, también denominada C5 activado, en fragmentos C5a y C5b.

Los expertos en la materia saben que la especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se determina principalmente por las regiones CDR (Región Determinante de Complementariedad) que se definen como regiones hipervariables del anticuerpo. Existen tres regiones hipervariables para cada región variable en la cadena tanto pesada como ligera. Sin embargo, no están aceptados unánimemente los límites precisos de las regiones menos variables o "flanqueantes" entre las que están comprendidas las CDR. De hecho existen dos clasificaciones diferentes. La primera se basa en "variabilidad de secuencia" (Kabat y col.), mientras que la segunda se basa en "variabilidad estructural" (Chothia y col.). Sin embargo, debido a que la especificidad de unión a antígeno se debe principalmente a las regiones CDR, ha sido posible, mediante el uso de técnicas recombinantes de ADN, obtener por ingeniería genética anticuerpos quiméricos que explotan la especificidad de unión de CDR murina montada sobre las regiones flanqueantes de anticuerpos humanos. La especificidad de dichos anticuerpos resulta ser la misma que para el anticuerpo murino la presente invención está compuesta de secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las 3 regiones CDR de la parte variable de la cadena ligera y de las 3 regiones CDR de la parte variable de las cadenas pesadas (SEC ID N° 7, 8, 9 respectivamente). Por lo tanto se incluyen en el intervalo de la realización particular de la presente invención todos los anticuerpos generados por "injerto" de las regiones CDR o al menos la tercera CDR, correspondiente a la SEC ID N° 9, en otra estructura de apoyo del anticuerpo o en estructuras de apoyo de tipo anticuerpo. Los ejemplos de las últimas son "minicuerpos" en los que la CDR de la invención se posiciona tridimensionalmente de manera que mantenga la especificidad de unión de C5.

También se desvela un anticuerpo humano recombinante caracterizado por el hecho de que comprende como regiones CDR al menos tres de las secuencias de aminoácidos identificadas en la lista de secuencias, como: SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9 o sus mutaciones conservativas.

Además se desvelan proteínas quiméricas que comprenden al menos uno de los polipéptidos correspondientes a las SEC ID N° 2, 4 ó 6 o los obtenibles por medio de técnicas de ingeniería genética que portan mutaciones conservativas o no conservativas y al menos 95%, más preferentemente 98% o incluso 99% homólogos a las secuencias originales. Por lo tanto la divulgación se extiende a polipéptidos que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos específicas de anticuerpo definidas como SEC ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, también cuando estos se preparan en una forma que difiere de la forma canónica o natural de los anticuerpos. También se desvelan inmunoglobulinas quiméricas que comprenden al menos una de las secuencias de aminoácidos identificadas como SEC ID NO: 2, 4 ó 6 o dominios funcionales derivados de tales secuencias en combinación con la secuencia de

aminoácidos de regiones constantes de cadena pesada de Ig (inmunoglobulina) o subdominios de estas regiones (es decir, dominios CH<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>) derivados por ejemplo de secuencias de aminoácidos (aa) conocidas en la base de datos (es decir, gen de cadena pesada de Ig A humana de 00220, gen de cadena pesada de Ig G humana AF 237583, cadena pesada de Ig gamma L27437 de *Mus musculus*, región de cadena pesada M28671 de *Rattus Norvegicus*).

Preferentemente el anticuerpo es dimérico. También son secuencias seleccionadas entre SEC ID N°: 2, 4 ó 6 cuando portan mutaciones sustituciones o deleciones de aa que no alteran la especificidad de unión del anticuerpo de la invención. Las secuencias de aminoácidos de la Lista de Secuencias también pueden comprender péptidos adicionales situados en el extremo C o N-terminal, como por ejemplo la secuencia “marcadora” o “de marca” que son útiles para la purificación o reconocimiento inmunológico del anticuerpo recombinante en sus diversas formas o cuando portan deleciones en el extremo C o N-terminal, pero que no alteran su especificidad de unión.

Un tipo particularmente preferido de secuencia “marcadora” es la cola de polihistidina, codificada por el vector de expresión usado en la presente invención, que se expresa en el extremo C-terminal de la secuencia SEC ID N° 6 para facilitar la purificación de afinidad en una columna de níquel. Otro marcador de secuencia es el SV5 de SIV, que se añade para facilitar el reconocimiento inmunológico.

Un aspecto adicional se representa por todas las secuencias de nucleótidos resultantes de degeneración del código genético, caracterizadas por el hecho de que codifican el anticuerpo scFv con la secuencia SEC ID N° 6 o la cadena pesada VH correspondiente a SEC ID N° 4 o la cadena ligera correspondiente a SEC ID N° 2 y las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen al menos 95% de homología, preferentemente 98% o 99% de homología con la SEC ID N° 6, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 2, preferentemente con SEC ID N° 4 o que codifican sus variantes conservativas. Por lo tanto las secuencias de nucleótidos identificadas con la SEC ID N° 1, 3, 5 o la Lista de Secuencias o secuencias de nucleótidos que comprenden tales secuencias, representan una realización particularmente preferida de las secuencias de nucleótidos.

También se incluyen en la divulgación todas las secuencias de nucleótidos obtenidas por medio de “mutagénesis parsimoniosa” (Shier, R., y col, 1996, Gene 169: 147) o por medio de otros procedimientos de mutagénesis dirigida o aleatoria o secuencias de nucleótidos de la presente invención, en particular SEC ID N° 1, 3, 5 (Marks, J. D., y col., 1992, J. Biol. Chem. 267:16007) realizados para mejorar algunas de las propiedades de los anticuerpos, como por ejemplo la afinidad, mientras se mantiene la especificidad de unión por el sitio de escisión de C5. Además la presente invención incluye todos los anticuerpos scFv en los que la secuencia que codifica la región VH, correspondiente a SEC ID N° 3, se mantiene constante, mientras que la secuencia que codifica la región VL del anticuerpo TS-A12/22, correspondiente a SEC ID N° 1, se reemplaza por “redistribución de cadenas”, por ejemplo usando colecciones (“bibliotecas”) de regiones humanas VL.

Las secuencias de nucleótidos objeto de la presente invención se clonan en vectores adecuados para su amplificación, mutagénesis o modificación adicional o expresión. Por lo tanto, los vectores que contienen al menos una de las secuencias de nucleótidos SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11 como en la lista de secuencias representa un aspecto adicional de la invención. Estas se usan preferentemente para preparación de anticuerpos recombinantes o de proteínas quiméricas en un huésped adecuado y siguiendo procedimientos conocidos en la técnica.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos recombinantes se clonan y se expresan preferentemente en huéspedes procariotas: particularmente se prefiere *E. coli*, pero también pueden usarse otros huéspedes procariotas, tales como *B. subtilis*, *P. pastoris*, *K. lactis*, o células eucariotas de origen animal o vegetal. Los vectores de expresión que contienen tales secuencias de nucleótidos se optimizan para expresión en cada uno de estos huéspedes, por inserción de regiones reguladoras, promotores, terminadores o activadores de transcripción u orígenes de replicación adecuados. Un vector de expresión particularmente preferido de acuerdo con la presente invención se representa por un vector de expresión periplásmica para *E. coli*, en particular el vector pDANS (Sblattero, D. y Bradbury A., 2000, Nat. Biotechnol. 18:75).

El anticuerpo o las proteínas quiméricas que tienen la especificidad descrita en la presente invención inhiben la conversión de C5 a sus productos biológicamente activos. En particular, mediante el bloqueo de la formación de C5b bloquean la formación del complejo terminal C (TCC) que conduce a la formulación del MAC (Complejo de Ataque a Membrana) que es capaz de determinar lisis celular masiva y daño tisular significativo. Además, mediante la inhibición de la formación de C5a también inhiben la actividad quimiotáctica de C5a para Leucocitos Polimorfonucleares y monocitos, que tras la estimulación producen citocinas tales como IL-1, IL-6, IL-8 u otros mediadores inflamatorios importantes tales como Serina-elastasas, peroxidasa, etc.

La actividad quimiotáctica de C5a y la actividad citolítica de MAC, para cuya formación participa C5b, se consideran las principales causas de daño tisular inducido en varias enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, se han descubierto niveles elevados de fragmento C5a y de TCC en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide o en el fluido cerebroespinal de pacientes con varias enfermedades del sistema nervioso central.

Por lo tanto un aspecto adicional de la invención se refiere al uso terapéutico de anticuerpos anti-C5 recombinantes de la invención, que portan la capacidad de inhibir la conversión del componente C5 a C5a y C5b, en una de las

formas descritas en la invención: scFv, VH y/o VL solos o en combinación con regiones constantes de Ig, preferentemente de origen humano, de ratón o de rata, proteínas quiméricas o regiones variables sencillas y sus mutaciones conservativas, variantes isotípicas etc. Este aspecto también se refiere al uso terapéutico de sus realizaciones preferidas compuestas de las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 2, 4, 6 de la Lista de Secuencias.

5 De acuerdo con la invención, los anticuerpos bloquean la conversión de C5 por la C5 convertasa. Esta enzima puede activarse por la ruta clásica iniciada por el componente de complemento C1q desencadenada por complejos antígeno-anticuerpo o de agregados de IgG o IgM o por la ruta de activación alternativa iniciada por sustancias naturales tales como lectinas, bacterias o paredes celulares de levadura o algunos venenos de serpientes o factores nefríticos. Por lo tanto se ha evaluado si los anticuerpos o proteínas de la invención bloquean selectivamente una o  
10 la otra de las dos rutas de activación del complemento. Basándose en experimentos *in vitro* realizados por ensayos hemolíticos en eritrocitos de oveja (SRBC: Glóbulos Rojos de Oveja) o en eritrocitos de conejo (RBC), los anticuerpos y proteínas de acuerdo con la presente invención inhiben las rutas de activación del complemento tanto clásica como alternativa. Una ventaja proporcionada por el uso de anticuerpos o proteínas que tienen especificidad por el componente C5 de acuerdo con la presente invención es que los componentes del complemento iniciales  
15 siguen estando disponibles para otras funciones de sistema de complemento tales como opsonización y eliminación de inmuno-complejos. Este enfoque terapéutico resulta ser ventajoso sobre un bloqueo potencial en el nivel del componente C3 que precede la acción del componente C5. Un bloqueo en el nivel del componente C3 conduciría a un bloqueo total de la cascada del complemento y de sus funciones en opsonización y eliminación de inmunocomplejos.

20 Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, los anticuerpos o las proteínas de la invención, en una de las realizaciones descritas o en las obviamente derivables de ellas, se usan para preparaciones farmacéuticas para tratamiento de enfermedades causadas o acompañadas por hiperactivación del sistema de complemento. La invención extiende el uso de anticuerpos y proteínas de la invención y sus secuencias de nucleótidos codificantes, al campo del diagnóstico, en el área de diagnóstico de trastornos caracterizados o acompañados por activación  
25 incontrolada del sistema de complemento, en particular del componente C5 o de sus fragmentos biológicamente activos.

Más preferentemente, los polipéptidos y anticuerpos de la invención se usan para tratamiento o prevención de enfermedades causadas o acompañadas por acción citotóxica y pro-inflamatoria del complejo terminal C (Complejo Terminal C TCC), en el que en particular tales enfermedades comprenden inflamación crónica y en particular artritis reumatoide, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas desmielinizantes, aterosclerosis o algunos  
30 trastornos autoinmunes.

Además, ensayos experimentales han demostrado que polipéptidos y anticuerpos anti-C5 de la invención son terapéuticamente útiles tanto en tratamiento como en prevención de patologías inflamatorias agudas inducidas o acompañadas por activación masiva del componente C5, que actúa a través de la actividad quimiotáctica del  
35 fragmento C5a, así como a través de la actividad de TCC iniciada por el fragmento C5b. Por ejemplo, las patologías agudas están representadas por sepsis bacteriana, daño tisular, por ejemplo daño del miocardio, del nervioso central, daños debidos a trasplante o causados por isquemia y reperfusión después de isquemia.

Además, un aspecto adicional de la invención se refiere al uso terapéutico de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o proteínas de la invención o los vectores que los contienen. Estos se usan preferentemente  
40 en terapia génica somática de enfermedades inducidas o acompañadas por activación masiva del componente C5, por activación incontrolada del sistema de complemento, por producción excesiva de fragmentos C5a y C5b, por producción excesiva de componentes del complemento C5 a C9, como en artritis reumatoide o en algunos trastornos autoinmunes. Sometiéndose a variabilidad individual y estado de salud general, no es fácil cuantificar un nivel mayor que el normal de activación del sistema de complemento y de la conversión del componente C5 activado  
45 a sus fragmentos biológicamente activos. Por lo tanto los niveles anómalos se definen pragmáticamente como los que son capaces de causar un estado patológico agudo o crónico.

La producción *in vivo* e *in vitro* de anticuerpos de la invención en animales transgénicos, obtenidos por manipulación genética de mamíferos no humanos usando al menos una de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención por procedimientos conocidos para los expertos en el campo, también está comprendida dentro del  
50 alcance de la presente invención. Esto representa una aplicación útil para el estudio de enfermedades genéticas caracterizadas por producción insuficiente de C5a y C5b o por hiperactivación de componentes del complemento de C5 a C9.

Los anticuerpos y proteínas de la invención y sus secuencias de nucleótidos codificantes pueden prepararse para uso terapéutico en forma de compuestos farmacéuticos en combinación con excipientes adecuados y/o diluyentes  
55 preferentemente para administración parenteral.

Además, los anticuerpos de la invención permiten la preparación de kits de diagnóstico, terapéuticos o de investigación, cuando tales kits comprenden al menos uno de los anticuerpos o de las cadenas variables descritas en la invención, correspondientes a las secuencias SEC ID N° 2, 4, 6 o sus variantes homólogas o fragmentos generados para diagnóstico o pronóstico de enfermedades caracterizadas por hiperactivación del componente C5 o

sus secuencias de ADN codificantes. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias SEC ID N° 1, 3, 5 y sus secuencias homólogas, se usan preferentemente para preparar un kit para transfección de células eucariotas.

5 La presente invención también comprende la realización de un kit de acuerdo con la reivindicación 25 para seleccionar compuestos que interfieren o modulan la escisión de la cadena alfa del componente de complemento C5 en sus fragmentos biológicamente activos. La realización de dicho kit implica el uso de los polipéptidos de la invención, preferentemente la cadena VH (SEC ID N° 4) o la cadena scFv (SEC ID N° 6) y al menos uno de los siguientes polipéptidos: componente de complemento C5 y su cadena alfa o un péptido que comprende el sitio de escisión para C5 convertasa, preferentemente correspondiente a la secuencia SEC ID N° 15. Los compuestos  
10 pueden identificarse, por ejemplo, por medio de un ensayo competitivo que detecte la inhibición de la unión péptido-anticuerpo usando al menos una de las secuencias de la invención. Los anticuerpos y polipéptidos de la invención, independientemente del hecho de que se originen de una biblioteca de anticuerpos humanos, se caracterizan por la capacidad de reconocer el componente de complemento C5 en el nivel de un epítipo presente en la cadena alfa del componente C5 y que comprende la región de escisión de C5 convertasa. La especificidad de unión del anticuerpo  
15 de la invención para el epítipo que comprende el sitio de escisión para C5 convertasa se sitúa entre glicina 733 y arginina 734 en C5 humano, de acuerdo con la numeración de la base de datos SwissProt (SEC ID P01031). Este epítipo podría localizarse diferencialmente en C5 de especies de mamífero no humanas tales como rata, ratón, conejo; sin embargo se considerará que tiene la misma especificidad, si tuviera el efecto de bloquear la conversión del C5 respectivo a C5a y C5b. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de anticuerpos anti-C5 de la invención para establecer modelos experimentales animales de enfermedades inducidas o  
20 acompañadas por hiperactivación del sistema de complemento y en particular del componente C5.

También se desvela el péptido de factor de complemento C5 que pertenece a especies de mamífero, y preferentemente seres humanos, que comprende el sitio de escisión para C5 convertasa. Este péptido es preferentemente el que comprende la región correspondiente a los aminoácidos 731-740 de la proteína madura humana. Incluso más preferentemente el péptido tiene la secuencia KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK, correspondiente a la secuencia de aminoácidos 727-744 de la proteína humana. Los péptidos se usan para la preparación de medicamentos, por ejemplo vacunas, o como inmunógeno para preparar antisueros para la prevención y tratamiento de condiciones patológicas que implican activación descontrolada del componente de complemento C5 tales como  
25 artritis reumatoide o algunos trastornos autoinmunes.

30 De acuerdo con este aspecto adicional, la invención incluye también el uso de un péptido que comprende la región correspondiente a la secuencia de aminoácidos 131-740 de la proteína humana madura o de un péptido que comparte al menos 80% de homología con dicha región, más preferentemente al menos 90%, 95% o 98% de homología incluyendo las regiones correspondientes del componente C5 de mamíferos no humanos. Este aspecto de la invención incluye el uso de un péptido que tiene la secuencia KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (derivada de la proteína humana) o de un péptido que tiene al menos 80%, más preferentemente al menos 90%, 95% o 98% de homología con dicho péptido, junto con o como alternativa a anticuerpos recombinantes anti-C5, en particular los que comprenden la región variable de la cadena pesada VH, correspondiente a SEC ID N° 4, o el anticuerpo scFv, correspondiente a SEC ID N° 6, a usar para la selección de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 1.

## **Sección experimental**

### **40 Materiales.**

*Biblioteca de anticuerpos.* La biblioteca de anticuerpos usada, que tiene una complejidad de  $7 \times 10^9$ , derivó de linfocitos periféricos no inmunes (vírgenes) humanos. La construcción de esta biblioteca se describe en Sheets, M. D., y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96:6157.

45 *Bacterias.* La amplificación de fagos fue en cepa de *E. coli* DH5aF' (*F'endA1 hsdR17* (rK<sup>-</sup>mK<sup>+</sup>) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal) *relA1 D* (*lacZYA-argF*) *U169 deoR* (*F80dlacD(lacZ)M15*)). Para la preparación del fragmento de scFv se usó la cepa de *E. coli* HB2151 (*K12, ara* (*lac-pro*), *thiF* *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *lackf*<sup>+</sup>*ZM15*).

50 *Proteínas purificadas.* Los componentes purificados C4 a C9 se obtuvieron de Quidel (San Diego, CA) y el componente C5a recombinante humano se obtuvo de Sigma Aldrich S.r.l. (Milán, Italia). Las subunidades alfa y beta de C5 se obtuvieron por incubación de 50 µg de C5 diluido en TRIS-HCl 0,55 M pH 8,1, que contenía DTT (0,02 M) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), seguido de tratamiento con yodoacetamida (0,12 M) durante 1 hora a TA. Las cadenas alfa y beta se purificaron por filtración en gel en Superosa 12 (Pharmacia Biotech, Milán, Italia) en cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) y la pureza se evaluó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

55 *Sueros.* Se obtuvo un suero con carencia del componente de complemento C5 (C5D) de un paciente con infección meningocócica. Los niveles de C5 estaban por debajo de la detección y no había actividad hemolítica en este suero y se restauró por adición de C5 exógeno. Se usó suero humano obtenido de donantes de sangre como una fuente de factor C5.

*Preparación del intermedio EAC1-3b para ensayo hemolítico.*

Se sensibilizaron eritrocitos de oveja (SBRC: glóbulos rojos de oveja) con cantidades sub-aglutinantes de IgM de conejo (EA). El intermedio EAC1-3b para reacción hemolítica se preparó por incubación de eritrocitos sensibilizados para anticuerpos (EA) con suero empobrecido para C5 diluido 1/10 (C5D) en tampón salino que contenía glucosa y Veronal (GVBS). Se realizó una incubación durante 70 minutos a 37°C, seguido de adición de suramina (Bayer, FRG) para bloquear la reacción de degradación, como se describe en Harrison, R. A. y P. J. Lachmann (Harrison, R. A. y P. J. Lachmann. 1986. Complement technology. In Handbook of Experimental Immunology. D. M. Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell y A. Herzemberg Leonore, eds. Blackwell Scientific Publ, Londres).

*Antisueros.* Dos anticuerpos monoclonales anti-C5a (Oppermann y col, Complement Inflamm., 1991, 8: 13) y un antisuero anti-C5 de cabra (Quidel, San Diego, California, Estados Unidos).

**Ejemplo 1. Amplificación y selección de biblioteca de fagos.**

Se obtuvieron fagos y se amplificaron como se describe en Marks, J. D. y col, 1991, J. Mol. Biol. 222:581. La selección se realizó en "inmuntubos" (Nunc, Mascia Brunelli, MI, IT) revestidos con proteína C5 purificada. El revestimiento de los "inmuntubos" se obtuvo por incubación con una solución de C5 (10 µg/ml en PBS) durante una noche a 4°C. Los fagos se diluyeron en PBS que contenía leche en polvo desnatada al 2% (MPBS) y se incubaron en inmuntubos durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, los inmuntubos se lavaron 20 veces con PBS que contenía Tween 20 0,1% (PBST) y 20 veces con PBS. Las partículas de fago unidas a inmuntubos se eluyeron con 1 ml de cultivo bacteriano de *E. coli* a una densidad de DO<sub>600</sub> 0,5 durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron después ampicilina (75 µg/ml), fago auxiliar y kanamicina (25 µg/ml) y se dejó crecer el cultivo durante una noche.

Después de un segundo ciclo de selección en inmuntubos revestidos con C5, se amplificaron las células de *E. coli* eluidas para extraer el ADN del fagémido usando procedimientos conocidos en la técnica. El ADN extraído se usó como un molde para amplificaciones por PCR separadas de las regiones VH y VL y ensamblaje posterior y clonación en vector pDAN5 (Sblattero, D. y Bradbury, A, 2000, Nat. Biotechnol. 18:75). El vector pDAN5 es un vector fagémido que contiene regiones lox y His<sub>6</sub> y la región de reconocimiento para la proteína p27 SV5 del virus SIV, caracterizado por el hecho de que las regiones VH y VL insertadas en el vector se expresan en el orden VL-VH, con la cadena ligera en el extremo N-terminal. Después de la transformación con el fagémido, las células de *E. coli* se incubaron con el fago auxiliar y las partículas de fago se usaron para un tercer ciclo de selección. Después de la elución, se analizaron los clones con respecto a su capacidad para unirse a C5 de acuerdo con lo que se describe en el Ejemplo 2.

**Ejemplo 2. Aislamiento de partículas de fago con especificidad de unión por el antígeno C5.**

Las partículas de fago obtenidas después de tres ciclos de "selección" de C5 en inmuntubos (como se ha descrito en el Ejemplo 1), se usaron para infectar células de *E. coli* crecidas en medio sólido. Las colonias bacterianas sencillas se transfirieron a placas de 96 pocillos y los fagos resultantes se ensayaron adicionalmente mediante ELISA con respecto a su capacidad para unirse a C5. El antígeno C5, a una concentración de 10 µg/ml en tampón de bicarbonato 0,1 M pH 9,6, se unió a las placas por incubación durante una noche a 4°C. Después de saturación de las placas con MPBS (PBS que contenía leche desnatada en polvo 2%), se diluyeron 50 µl de suspensión de fago con un volumen idéntico de MPBS; se añadió después un anticuerpo monoclonal anti-pIII (proteína M13) conjugado con HRP (Pharmacia Biotech). La unión positiva se reveló mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidín diclorato (Sigma-Aldrich) como sustrato y absorbancia a 450 nm mediante lectura espectrofotométrica.

Los clones positivos por el ensayo ELISA se seleccionaron adicionalmente basándose en la diferencia de los fragmentos codificantes de región V. Las regiones V se amplificaron usando cebadores específicos como se describe en Marks y col (trabajo citado), se escindieron con BstNI y se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 2%. Se aislaron doce clones que demostraron ser diferentes entre sí basándose en su patrón electroforético.

**Ejemplo 3. Preparación de anticuerpos ScFv de cadena sencilla solubles.**

Los clones de fago obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 2 se usaron para infectar la cepa de *E. coli* HB2151 para obtener expresión de fragmentos de scFv en forma soluble. Se indujeron las bacterias crecidas hasta D. O. 0,5 en medio 2XYT, que contenía ampicilina, con isopropil-β-tiogalactopiranosido y se cultivaron adicionalmente durante 5 horas. La fracción periplásmica que contenía anticuerpos scFv se preparó por incubación con reactivo B-PER (Pierce, Celbio, MI, IT) durante 20 minutos a TA, seguido de centrifugación durante 15 minutos a 27000 x g. El sobrenadante se dializó frente a PBS y se purificaron los anticuerpos de cadena sencilla que contenían la cola de poli-histidina en el extremo C terminal por cromatografía de afinidad en resina de Ni-NTA de níquel (Qiagen, MI, IT).

La capacidad de unión de anticuerpos de cadena sencilla purificados para el factor C5 se verificó por medio de un ensayo ELISA de fase sólida. Este fue análogo al que se usó para partículas de fago. En lugar del anticuerpo dirigido a pIII de M13, el anticuerpo usado para detección fue un anticuerpo monoclonal contra el marcador SV5 peptídico

expresado en el extremo C terminal de anticuerpos de cadena sencilla.

El protocolo para el ensayo ELISA fue el siguiente: los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos se revistieron con antígeno (C5 purificado, 250 ng) por incubación durante una noche a 4°C en tampón de bicarbonato sódico 0,1 M, pH 9,6 y después se lavaron con PBS 0,1% Tween 20 (PBST). Se bloquearon los sitios de unión residual con PBS que contenía BSA 1% durante 1 hora a 37°C. Se incubaron después extractos bacterianos o anticuerpo scFv de cadena sencilla purificado (1 µg/ml) y se revelaron con anticuerpo anti-marcador SV5 (diluido 1/1000) seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (diluido 1/1000) durante 1 hora de incubación a 37°C. La reacción enzimática se desarrolló con p-nitrofenilfosfato (Sigma Aldrich; 1 mg/ml) como el sustrato en tampón de glicina 0,1 M pH 10,4 que contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ZnCl<sub>2</sub> 1 mM y se leyó la absorbancia a 405 nm por el lector de ELISA Titertek multiskan.

Se descubrió que todos los anticuerpos scFv purificados eran capaces de unirse al factor C5 por el ensayo ELISA descrito.

**Ejemplo 4. Determinación de la afinidad de unión del anticuerpo scFv TS-A12 por el factor C5 mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).**

La afinidad de unión del anticuerpo Tsa-12, purificado por medio de FPLC en Superdex 75 (Pharmacia), para el factor C5 se midió por medio de BIACORE 2000. La microplaca (CM5, Biacore) se preparó por conjugación directa del antígeno C5 con aminas (20 µg/ml en acetato sódico 10 mM pH 4,5). El nivel final de inmovilización resultó ser de aproximadamente 1000 UR (unidades de resonancia). La asociación y disociación de las moléculas de anticuerpo de la biomicroplaca se midieron usando un sistema de detección óptica (Resonancia de Plasmón Superficial).

El análisis se llevó a cabo a 25°C, con un flujo de 15 µl/min, usando 4 concentraciones de scFv diferentes en el intervalo comprendido entre 100 y 300 nM, en PBS, P20 0,005% (Biacore). Las curvas de unión se interpolaron 1:1 de acuerdo con el modelo de Langmuir, usando el software dedicado denominado BIAevaluation (versión 3.5) con corrección para la transferencia de masa. Las mediciones realizadas en la constante de disociación en equilibrio se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Velocidades de asociación y disociación de scFV TS-A12 en C5 purificado inmovilizado en microplaca.**

Clon	$k_{on}$ ( $10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$K_D$ ( $10^{-9} \text{ M}$ ) <sup>a</sup>
TSA-12	1,3	0,026	200

<sup>a</sup> La constante de equilibrio se calculó como  $K_D = k_{on}/k_{off}$

Como se muestra en la Tabla 1, la KD calculada para el anticuerpo TS-A12 resulta ser de  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$  (afinidad sub-micromolar), como se espera para anticuerpos derivados de colecciones (bibliotecas) de anticuerpos no inmunes.

**Ejemplo 5. Afinidad aumentada del anticuerpo TS-A12 por medio de “redistribución de cadena”.**

Para aumentar la afinidad, el anticuerpo TS-A12 se sometió a sustitución (“redistribución”) de las cadenas ligeras VL. Para este fin el ADN del fagémido se cortó con BssHII y Sall para escindir la región VL. Esta región se sustituyó con todo el repertorio de cadenas VL de una biblioteca preinmune (Sblattero, D. y Bradbury A., 2000, NAT. Biotechnol. 18:75) que se preparó con las mismas enzimas. La biblioteca se sometió a tres ciclos de selección en el antígeno, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, hasta que se obtuvo una serie de anticuerpos específicos para C5. Entre estos está TS-A12/22 que tiene constante de disociación, según se mide con BIACORE 2000 de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo anterior, de  $1,8 \times 10^{-8} \text{ M}$ , por lo tanto con un incremento de afinidad molar de aproximadamente un orden de magnitud.

**Ejemplo 6. Caracterización de la inhibición de los anticuerpos scFv antiC5 de la conversión de C5 a C5a.**

Los fragmentos scFv anti-C5 obtenidos se caracterizaron adicionalmente con respecto a su capacidad para inhibir la actividad hemolítica de C5 o, en otras palabras, bloquear la conversión del componente C5 a C5a. Para este fin, se incubó una cantidad pequeña de componente C5 purificado, durante 30 minutos a TA, con anticuerpos scFv anti-C5 purificados o con un scFv no relacionado (anti-gliadina) o con VBS (Solución Salina de Tampón Veronal) como control. La mezcla se añadió después a eritrocitos de ovejas sensibilizados con cantidades sub-aglutinantes de IgM de conejo (EA) (véase Harrison, R. A. y P. J. Lachmann. 1986. Complement Technology. In Handbook of Experimental Immunology. D.M.Weir, L. A. Herzemberg, C. Blackwell y A. Herzemberg Leonora, eds Blackwell Scientific Publ, Londres) revestido con componentes de C1 hasta C3b (EAC1-3b) que permiten revelar la activación de C5 a través de la ruta clásica. La suspensión de eritrocitos se resuspendió en suero empobrecido para C5 (C5D) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Al final de este procedimiento, se midió la lisis celular como porcentaje del control de lisis total en H<sub>2</sub>O destilada (véase Figura 1, panel B). La inhibición de producción de C5a y TCC por los

scFv TS-A12 y TS-A12/22 se midió por medio de ELISA usando el anticuerpo monoclonal 17/5 como el anticuerpo de captura y anticuerpo G25/2 como anticuerpo de detección de acuerdo con lo que se ha descrito en Opperman y col.1991, Complement Inflamm. 8:13. La presencia de TCC se midió usando anticuerpo aE11 como el anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-C5 biotinilado (Sigma Aldrich) seguido de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, como se describe en Tedesco y col (1997, J Exp. Med 185:1619).

Los resultados del ensayo se presentan en la Figura 1, en la que se muestra que los anticuerpos TS-A12 y TS-A12/22 inhiben casi completamente la formación de C5a (Figura 1A) (ruta clásica) y de TCC (Figura 1B) mientras que los otros scFv aislados son eficaces sólo parcialmente o hasta un alcance limitado. La presencia de VBS o de un scFv no relacionado en la mezcla de reacción no mostró, como se esperaba, ningún efecto inhibitorio.

#### 10 **Ejemplo 7. Determinación de la secuencia del anticuerpo TS-A12/22.**

El fragmento VH y VL de clones positivos se comparó con secuencias de anticuerpo conocidas publicadas en la base de datos VBASE (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>). Se descubrió que la cadena pesada VH del anticuerpo TS-A12/22 derivaba de la cadena VH3/V-48 y la cadena ligera de V $\lambda$ 3/V2-14. La secuencia de ADN que codifica el anticuerpo scFV TS-A12/22 se indica en la lista de secuencias como SEC ID N° 5 y la secuencia de aminoácidos derivada como SEC ID N° 6.

#### 15 **Ejemplo 8. Mapeo del sitio de reconocimiento del anticuerpo TS-A12/22 en la molécula C5.**

Se caracterizó primero, por medio de la técnica de transferencia de Western, si el anticuerpo TS-A12/22 reconoce la subunidad alfa o beta del componente de complemento C5 preparado como se describe en materiales. Brevemente las dos subunidades se sometieron a electroforesis en pocillos separados y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se usó una solución que contenía Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 0,5 M y leche en polvo desnatada 4% para bloquear sitios no específicos durante 1 hora a 37°C. Se revelaron las membranas por incubación con una dilución adecuada del anticuerpo TS-A12/22 durante 1 hora a 37°C, seguido de incubación con un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina o con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). La reacción enzimática se desarrolló con tetrazolio azul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich, 0,30 mg/ml) diluido en Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 que contenía NaCl 0,1 M y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Se usaron Rainbow RPN 756 (Amersham Italia) como marcadores de peso molecular. Como se muestra en la Figura 2, el anticuerpo TS-A12/22 de la invención reconoce la subunidad alfa del factor C5, cargada en el carril 1, pero no reconoce la subunidad beta, cargada en el carril 2.

Puesto que el anticuerpo TS-A12/22 purificado también inhibió la actividad hemolítica debido a inhibición de la conversión de C5 a C5a, como se demuestra en el Ejemplo 9, se verificó después la hipótesis de que el anticuerpo podría reconocer como sitio de unión el sitio de escisión para C5 convertasa.

Para verificar esta hipótesis, se sintetizó un péptido de 18 aminoácidos, con la secuencia: KDMQLGR<sup>1</sup>LHMKTL<sup>18</sup>PVSK (P5A-18 también denominado C5cs que comprende SEC ID N° 15). Este péptido corresponde a la región 727-744 de la proteína madura y comprende el sitio de escisión de C5 convertasa (indicada por la flecha) entre glicina 733 y arginina 734 de acuerdo con la numeración de SwissProt para C5 humana (SEC ID P01031). El péptido se usó en un ensayo ELISA competitivo en la proteína C5 en fase sólida. Antes de unirse a la fase sólida, el anticuerpo TS-A12/22 se preincubó con el péptido P5A-18, correspondiente a los aminoácidos 727-744 del componente C5 o con un péptido no relacionado de secuencia GEEIQGHIPREDVDYHLYP (SEC ID N° 16 de la lista de secuencias) correspondiente a un péptido derivado de fibronectina denominado CS5.

En la Figura 3 se muestran los resultados que se obtuvieron: el péptido P5A-18 inhibió la unión del anticuerpo TS-A12/22 con C5 y esta inhibición fue dependiente de dosis, variando de 45% a 90% para concentraciones de péptido de 200 ng y 800 ng/200  $\mu$ l, respectivamente. Este resultado confirma que el anticuerpo TS-A12/22 reconoce solamente esta región en el factor activado C5. Los valores de concentración corresponden a una K<sub>i</sub> peptídica de 1  $\mu$ M, que no es diferente de la K<sub>D</sub> medida por SPR para la proteína completa, de acuerdo con lo que se ha descrito en el Ejemplo 4.

Como se esperaba, tanto el péptido CS5 no relacionado como la proteína C5 completa resultaron ser ineficaces para inhibir la unión del anticuerpo TS-A12/22 con C5 activado, incluso a las mayores concentraciones usadas, indicando de este modo que la inhibición por el péptido C5cs (P5a-18) fue específica para la cadena alfa de C5.

#### 45 **Ejemplo 9 caracterización funcional del anticuerpo TS-A12/22. Inhibición de la actividad hemolítica y activación de TCC.**

Habiendo evaluado las características de la inhibición de la ruta de activación clásica del factor C5 por el anticuerpo TS-A12/22, se verificó después si estas también lo eran de la inhibición de la ruta alternativa de activación de C5 y a qué nivel. El ensayo se llevó a cabo usando eritrocitos de conejo como las células diana, de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Brevemente, se mezclaron cantidades crecientes de C5 con 600 ng del scFv de la invención o con un scFv no relacionado o con GVBS en el que se han solubilizado anticuerpos scFv y después se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para estimar la ruta clásica de activación del complemento, cada mezcla se añadió a una suspensión 1% de eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpo de conejo y revestidos con componente de complemento hasta C3b, denominado EAC1-3b. Para estimar la ruta alternativa de

activación del complemento, cada mezcla se añadió a una suspensión 1% de eritrocitos de conejo.

Se añadió suero con C5 agotado diluido 1/200 a cada suspensión de eritrocitos. Después de la incubación durante 30 minutos a 37°C, el porcentaje de lisis de eritrocitos se midió por comparación con un valor de 100% obtenido por lisis de eritrocitos con un volumen igual de H<sub>2</sub>O, destilada y con un blanco que consistía en eritrocitos resuspendidos en GBVS. Se realizó una lectura espectrofotométrica a 412 nm y los resultados se indican en la Figura 4: inhibición de lisis de EAC1-3b a través de la ruta clásica (panel A); inhibición de lisis de eritrocitos de conejo a través de la ruta alternativa (panel B). El anticuerpo TS-A12/22 inhibe la lisis de eritrocitos de conejo inhibiendo la conversión de C5 de forma similar a través de la ruta clásica y la ruta alternativa.

Puesto que la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de escisión de la convertasa en la cadena alfa de C5 se conserva en varias especies animales, se evaluó adicionalmente, por ensayo hemolítico, la capacidad del anticuerpo TS-A12/22 para inhibir la conversión de C5 a C5a también en suero de conejo, ratón y rata. El anticuerpo TS-A12/22 fue capaz de inhibir la actividad hemolítica presente en el suero de todas las especies animales ensayadas, aunque con diferente eficacia. Estos resultados se indican en la Figura 5, que muestra que la eficacia de inhibición de suero de rata fue prácticamente similar a la de suero humano, mientras que la eficacia fue mayor en suero de rata o conejo. Debería considerarse que una cantidad mayor de suero de conejo era necesaria para inducir un porcentaje de lisis comparable al inducido por C5 humano.

(La especificidad del anticuerpo TS-A12/22 se evaluó también en otros componentes de la cascada del complemento, como por ejemplo C3 y C4, que son estructuralmente similares a C5, pero se halló reactividad cruzada).

#### **Ejemplo 10. Uso *in vivo* de anticuerpo TS-A12/22.**

Para ensayar el efecto del anticuerpo TS-A12/22 *in vivo*, se midió el flujo de entrada de PMN en la articulación de rata inyectada con BSA, BSA y TS-A12/22 o BSA y anticuerpo no relacionado. Se demostró de este modo que la quimiotaxis de PMN, que es su número en el líquido de lavado de la articulación, se redujo significativamente en presencia de TS-A12/22 en comparación con ratas tratadas con BSA o con BSA y anticuerpo no relacionado (Figura 6). Además la deposición de los componentes del complemento C3 y C9 se comprobó en una sección histológica de la articulación de la pata trasera de ratas tratadas, por inmunofluorescencia con antisueros específicos y anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (Figura 7). Se descubrió que la deposición de C3 se conservó sin cambios como resultado de la administración de BSA más anticuerpo TS-A12/22 o de anticuerpo no relacionado, pero la deposición de C9 se inhibió fuertemente en presencia de TS-A12/22. Se confirmó de este modo que el anticuerpo TS-A12/22 inhibe la cascada de complemento en una etapa intermedia entre C3 y C9 y por lo tanto al nivel de la conversión de C5 a C5a + C5b.

#### **Ejemplo 11. Dimerización del anticuerpo scFvTS-A12/22.**

La secuencia del anticuerpo TS-A12/22 se modificó por la adición de dominios CH3 o CH2-CH3 al extremo C terminal y de una secuencia líder eucariota al extremo N terminal.

Estas modificaciones se dirigieron a:

- inducir dimerización de scFv, formando un complejo estructural, para aumentar la valencia de uno a dos y aumentar la estabilidad del anticuerpo (definido en lo sucesivo como "minicuerpo"). Basándose en los diferentes tipos de clonación, no se forman enlaces covalentes entre subunidades del dímero en construcciones que comprenden solamente CH3, mientras que las que comprenden dominios CH2-CH3 se forman dos enlaces disulfuro entre cisteínas de la región bisagra CH2 de los dos monómeros;
- hacer posible la producción de minicuerpos en cultivos celulares de mamífero con incrementos del rendimiento y ausencia de contaminantes bacterianos al final de los procedimientos de extracción y purificación;
- crear las condiciones para un análisis *in vivo* de la actividad biológica del minicuerpo en modelos animales, minimizando la respuesta inmune del huésped por adición de dominios CH3 y CH2-CH3 de la misma especie que el animal tratado (ratón o rata).

Las modificaciones anteriormente descritas se realizaron en dos etapas. Primero se clonó el scFv en el vector plasmídico pUT (Li E, y col. 1997 Protein Eng. 10:731-6) modificado convenientemente para permitir la inserción de la secuencia líder y de un dominio CH3 humano. El dominio humano CH3 se reemplazó después con una serie de construcciones de dominios de otras especies, como se indica posteriormente. Finalmente, un fragmento de vector pUT que comprende el minicuerpo en diversas versiones, se clonó en el vector comercial pcDNA3 (Invitrogen) y se ensayó con respecto a expresión en células de cultivo.

Para esto, el vector pUT que contenía un scFv no relacionado se modificó reemplazando el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción (RE) BspEI, localizado en el extremo de la cadena VH, con el sitio de BssH2. La sustitución de BspEI se realizó por PCR inversa realizada con los cebadores indicados en la Tabla 2 (referencias A y B).

5 La secuencia CH3 de ratón presente en el vector pUT se reemplazó después con una secuencia humana análoga amplificada por uso de los cebadores de referencia 1 y 2. El cebador 2 inserta además una secuencia marcadora SV5 (reconocida por mAB SV5) y los sitios de clonación SpeI, PvuI y EcoRI. Se usó ADNc de linfocitos B humanos como molde y se realizó inserción en pUT por restricción con las RE BssHII y PvuI y ligación posterior de vector y fragmento.

Como se indica en la Figura 8, los dominios Fc de anticuerpos humanos, de ratón y de rata se insertaron en el vector pUT que se había modificado como se ha descrito en el punto anterior. Las secuencias originales de los dominios CH2 y CH3 se obtuvieron de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>, usando los números de acceso:

- 10 *Homo sapiens* J00220 (locus: gen de cadena pesada IgA1)  
*Homo sapiens* AF237583 (locus: gen de cadena pesada IgG1)  
*Mus musculus*: L27437 (locus: cadena pesada de inmunoglobulina gamma)  
*Rattus norvegicus* M28671 (locus: RATIGG2B).

15 Los cebadores indicados en la Tabla 2 y el ADNc de linfocitos B de las especies correspondientes se usaron para clonación por PCR. La clonación en pUT se realizó por restricción con BssHII y SpeI y ligación después de la retirada de secuencia previa (CH3 humana).

20 La secuencia de scFv se clonó en una serie de vectores pUT que contenían dominios Fc de diferentes especies descritas en el punto anterior, por medio de PCR con una mezcla de oligonucleótidos universales para amplificación de scFv humanos conocidos (véase Sblattero D. y Bradbury A. Immunotechnology, 1998, 3:271-278, e indicado en la Tabla 3), seguido de digestión con enzimas de restricción ApaI y BssHII (ER).

La clonación en el vector pcDNA de las construcciones obtenidas en pUT se realizó por digestión con enzimas HindIII y EcoRI, recuperación selectiva del fragmento correspondiente y clonación en pcDNA3 que se cortó con las mismas ER (véase descripción en la Figura 8).

Tabla 2. Cebadores usados para amplificación de las regiones Fc indicadas (Ra=rata; Mo=ratón; Hu: humano).

	Nombre	Orientación	Secuencia
A SEC ID N° 17	PUT-ApaLI	Sentido	5'ATC CGA <u>GTC CAC ACC</u> TGT GGA GAG AAA GGC AAA G 3'
B SEC ID N° 18	PUT-BsshII	Antisentido	5'TCC TCA <u>GCG CGC GGC</u> TCT GGT GGC AGA CCG AAG G 3'
1 SEC ID N° 19	HuGCH3-s	Sentido	5' <u>CAG GCG GCG CGC</u> GGG CAG CCC CAG GAA CCA CAG 3'
2 SEC ID N° 20	HuGCH3-a	Antisentido	5'A CGT <u>CGA TCG CCT</u> GCT GAA TTC TTA AGT ACT ATC CAG GCC CAG CAG TGG GTT TGG GAT TGG TTT GCC <u>ACT AGI</u> TTT ACC CCG GGA CAG GGA GAG
3 SEC ID N° 21	HuGCH2-s	Sentido	5' AG GCG <u>GCG CGC</u> GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA 3'
4 SEC ID N° 22	HuA-CH2-s	Sentido	5'CAG GCG <u>GCG CGO</u> GTT CCC TCA ACT CCA CCT ACC
5 SEC ID N° 23	HuA-CH3a	Antisentido	5'CC GCT <u>ACT AGI</u> TTT ACC CCG CAA GCG GTC GAT
6 SEC ID N° 24	MoG-CH3-s	Sentido	5' CAG GCG <u>GCG CGO</u> GGC AGA CCG AAG GCT CCA C
7 SEC ID N° 25	MoG-CH3-a	Antisentido	5'CC GCT <u>ACT AGI</u> TTT ACC AGG AGA GTG GGA GAG
8 SEC ID N° 26	MoGCH2-s	Sentido	5'CAG GCG <u>GCG CGC</u> GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA
9 SEC ID N° 27	RaGCH3-s	Sentido	5'CAG GCG <u>GCG CGC</u> GGG CTA GTC AGA AAA CCA CAG
10 SEC ID N° 28	RaGCH3-a	Antisentido	5'CC GCT <u>ACT AGI</u> TTT ACC CCG AGG CCG GGA GAT G
11 SEC ID N° 29	RaGCH2-s	sentido	5' CAG GCG <u>GCG CGC</u> CAC AAA TGC CCT ACA TGC CCT

Tabla 3. Mezcla de Oligonucleótidos universales para amplificación de scFv de origen humano

Nombre	Orientación	Secuencia
VL1 SEC ID N° 30	Sentido	caggt <u>gtc cac</u> tcg gac atc crg dtg acc cag tct
VL2 SEC ID N° 31	Sentido	caggt <u>gtg cac</u> tcg gat att gtg wtg acn cag wct
VL3 SEC ID N° 32	Sentido	caggt <u>gtg cac</u> tcg cag cct gtg ctg car yc
VL4 SEC ID N° 33	Sentido	caggt <u>gtg cac</u> tcg tcc tat gwg ctg acw cag cca
JH1 SEC ID N° 34	Antisentido	gaccc <u>gcg cgc</u> gga gac rgt gac cag ggt
JH2 SEC ID N° 35	Antisentido	gaccc <u>gcg cgc</u> aga gac ggt gac crt kgt

### Ejemplo 12. Producción y validación del minicuerpo de rata TSA12/22-CH2-CH3.

- 5 El plásmido pcDNA que portaba la construcción para el anticuerpo TSA12/22, en la versión que contenía los dominios CH2-CH3, se usó para transfección *in vitro* de la línea celular HEK 293. Después del tratamiento con ADN y lipofectina, las células se seleccionaron en presencia del antibiótico G418. Después de dos semanas en cultivo, se ensayaron clones celulares sencillos para producción de anticuerpos por detección de la actividad en el sobrenadante. Se seleccionó un clon y se expandió para producción masiva del minicuerpo TSA12/22-CH2-CH3. Se llevó a cabo purificación del minicuerpo por cromatografía.
- 10 El anticuerpo TSA12/22 purificado en la versión que contenía los dominios CH2-CH3 de rata (minicuerpo TSA12/22 CH2CH3) se ensayó con respecto a su capacidad para inhibir la ruta de activación de complemento clásica en un ensayo *in vitro*, de acuerdo con las modalidades ya descritas en los ejemplos anteriores. En el diagrama de la Figura 9 se indica el porcentaje de inhibición de lisis de eritrocitos de conejo sensibilizados con IgM, mediada por complemento en presencia de concentraciones fijas de scFv TSA12/22 o un scFv no relacionado, de solución salina tamponada con GVBS y del minicuerpo compuesto por scFv TSA22/12 y dominios CH2-CH3 de rata.
- 15

La construcción Tsa12/22-CH2-CH3 mostró actividad inhibitoria significativamente mejor que el scFv correspondiente, como se puede observar en la Figura 9.

- 20 También se realizaron ensayos de actividad *in vivo* en el espacio de articulaciones de rata. Se indujo artritis en el tiempo  $t = 0$  por inyección intraarticular de metil-BSA (albúmina de suero bovino) después de que se hubiera inmunizado previamente el animal con metil-BSA. Se realizaron tratamientos terapéuticos con el minicuerpo por inyección intraarticular a  $t = 0$  y 6 días después de la inducción de la artritis. La eficacia del tratamiento se midió como número de leucocitos polimorfonucleares presentes en el lavado intraarticular y como reducción de hinchazón de la articulación, como puede observarse en la Figura 10 en la que se indica el recorrido de PMN (leucocitos polimorfonucleares) reclutados al espacio de articulación de rata en respuesta a inflamación inducida por BSA. El menor porcentaje de células en presencia de minicuerpo TSA22/12 CH2CH3, en dos puntos temporales considerados, indica una reducción del proceso inflamatorio. La Figura 11 presenta el efecto inhibitorio del minicuerpo TSA22/12 CH2CH3 en el alcance de hinchazón de las articulaciones causada por la reacción inflamatoria. Las mediciones realizadas después de 20 días evaluaron un efecto terapéutico del minicuerpo también a largo plazo, cuando se administró junto con BSA o 6 días después.
- 25

### 30 Conclusiones

- Se descubrió que los anticuerpos ScFv, aislados como se ha descrito en el Ejemplo 1, eran capaces de unirse al factor C5, según se evaluó por ensayo ELISA y como se esperaba a partir del tipo de selección o "panning" de partículas de fago realizado en C5. Sin embargo no todos los anticuerpos ScFv fueron capaces de inhibir la conversión de C5 a C5a + C5b y por lo tanto las funciones biológicas que siguen a su activación. Debido a que se une en proximidad al sitio de escisión de C5 convertasa en la cadena alfa del componente C5 activado y evita la producción de C5a y C5b, el anticuerpo TSA12/22 inhibe la actividad quimiotáctica inducida por el primero y la actividad hemolítica mediada por C5b a través de formación de MAC. Esta inhibición funciona cadena abajo de la activación del componente C3, por lo tanto es independiente del tipo de ruta de activación del complemento utilizada (clásica o alternativa).
- 35
- Además, el anticuerpo TSA12-22 dimerizado por medio de dominios CH2 y CH3 de rata (minicuerpo) resultó ser particularmente activo en el tratamiento a largo plazo.
- 40

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Università degli Studi di Trieste  
Consiglio Nazionale Ricerche

<120> Anticuerpo anti C5 del complemento y su uso

<130> 2728PTWO

5 <150> MI2002A001527  
<151> 11-07-2002

<160> 35

10 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 342

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

20 <223> Cadena ligera del anticuerpo TS-A12/22

<400> 1

gac atc cgg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48  
Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag 144  
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc 192  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa 288  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat 336  
Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
100 105 110

atc aaa 342  
Ile Lys

25 <210> 2  
<211> 114  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 2

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
 100 105 110

Ile Lys

<210> 3

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

10 <223> Cadena pesada del anticuerpo TS-A12/22

<400> 3

```

cag gta cag ctg cag cag tca gag gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt      144
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

tca tac att agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg      192
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gcg aga ggg cct ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc      336
Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
          100          105          110

gtc tcc tca
Val Ser Ser
          115

```

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

- <210> 5
- <211> 750
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(750)
- <223> scFV

10

- <400> 5

gac atc cgg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15	48
gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser 20 25 30	96
tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 35 40 45	144
cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60	192
cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr 65 70 75 80	240
atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln 85 90 95	288
tat tat agt act cct cag ctc act ttc ggc gga agg acc aaa gtg gat Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp 100 105 110	336
atc aaa tcc gga ggg tog acc ata act tcg tat aat gta tac tat acg Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr 115 120 125	384
aag tta tcc tcg agc ggt acc cag gta cag ctg cag cag tca gag gga Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly 130 135 140	432
ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser 145 150 155 160	480
gga ttc acc ttc agt agc tat ggc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro 165 170 175	528
ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt agt agt agt agt acc Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr 180 185 190	576
ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp 195 200 205	624
aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu 210 215 220	672

gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga ggg cct ggt atg gac gtc tgg 720  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp  
 225 230 235 240

ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 750  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 6

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Gln Leu Thr Phe Gly Gly Arg Thr Lys Val Asp  
 100 105 110

Ile Lys Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr  
 115 120 125

Lys Leu Ser Ser Ser Gly Thr Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Gly  
 130 135 140

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr  
 180 185 190

Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 195 200 205

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Gly Met Asp Val Trp  
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 7

<211> 15

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(15)

<223> Región CDR1 de VH

<400> 7

agc tat ggc atg aac

15

Ser Tyr Gly Met Asn

15 i 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 9

<211> 51

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

30 <222> (1)..(51)

<223> Región CDR2 de VH

<400> 9

tac att agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag

48

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

1 5 10 15

ggc

51

Gly

35

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 10



<400> 14

Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Gly Thr  
 20

5 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Péptido que comprende sitio de escisión de C5 convertasa. Correspondiente a aa 727-744 de proteína humana madura (P01031).

15 <400> 15

Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val  
 1 5 10 15

Ser Lys

20 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(20)  
 <223> Péptido derivado de fibronectina

30 <400> 16

Gly Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Ile Pro Arg Glu Asp Val Asp Tyr  
 1 5 10 15

His Leu Tyr Pro  
 20

35 <210> 17  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial/cebador

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(34)  
 <223> Cebador de PCR

<400> 17

45 atccgagtgc acacctgtgg agagaaaggc aaag 34

<210> 18  
 <211> 34  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial/cebador  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(34)  
 5 <223> Cebador de PCR  
  
 <400> 18  
  
 tctcagcgc gggctctgg tggcagaccg aagg 34  
 10  
 <210> 19  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(33)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank AF237583  
 20  
 <400> 19  
  
 caggcggcgc ggggacagcc ccaggaacca cag 33  
 25  
 <210> 20  
 <211> 94  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(94)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank AF237583  
 35  
 <400> 20  
  
**acgtcgatcg cctgctgaat tcttaagtac tatccaggcc cagcagtggg tttgggattg 60**  
**gtttgccact agttttaccc ggggacaggg agag 94**  
  
 <210> 21  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(41)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank AF237583  
 45  
 <400> 21  
 50  
 aggcggcgcg cgacaaaact cacacatgcc cacctgccc a 41  
  
 <210> 22  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(33)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank J00220  
 60

<400> 22  
 caggcggcgc gcggtccctc aactccacct acc 33

5  
 <210> 23  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(32)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank J00220

15  
 <400> 23  
 ccgctactag tttaccgc caagcggctg at 32

20  
 <210> 24  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(31)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank L27437

30  
 <400> 24  
 caggcggcgc gcggcagacc gaaggctcca c 31

35  
 <210> 25  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(32)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank J00220

45  
 <400> 25  
 ccgctactag tttaccagg agagtgggag ag 32

50  
 <210> 26  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(36)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank L27437

<400> 26  
 caggcggcgc gcggtgtaa gcctgcata tgtaca 36

60  
 <210> 27  
 <211> 33  
 <212> ADN

<213> Rattus norvegicus  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)..(33)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank M28671  
 <400> 27  
 10 caggcggcgc gcgggctagt cagaaaacca cag 33  
 <210> 28  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 15 <213> Rattus norvegicus  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(33)  
 20 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank M28671  
 <400> 28  
 25 ccgtactag ttttaccgg aggccgggag atg 33  
 <210> 29  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Rattus norvegicus  
 30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(33)  
 <223> Secuencia derivada de número de acceso de GenBank M28671  
 35 <400> 29  
 caggcggcgc gccacaaatg ccctacatgc cct 33  
 40 <210> 30  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(35)  
 <223> Oligonucleótido universal para amplificación de VL1.  
 50 <400> 30  
 cagggtgca ctggacatc crgdtgacc agtct 35  
 55 <210> 31  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(35)  
 <223> Nucleótido en posición 29 es oligonucleótido universal "n" para amplificación de VL2.  
 <400> 31

caggtgtgca ctcggatatt gtgwtgacac agwct 35

5 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1)..(31)  
 <223> Oligonucleótido universal para amplificación de VL3.

<400> 32

15 caggtgtgca ctcgcagcct gtgctgcary c 31

<210> 33  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(35)  
 25 <223> Oligonucleótido universal para amplificación de VL4.

<400> 33

30 caggtgtgca ctcgtcctat gwgctgacwc agcca 35

<210> 34  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <223> Oligonucleótido universal para amplificación de JH1.

40 <400> 34

gacccgcgcg cggagacrgt gaccagggt 29

45 <210> 35  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(29)  
 <223> Oligonucleótido universal para amplificación de JH2.

55 <400> 35

gacccgcgcg cagagacrgt gaccrtkgt 29

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano que tiene especificidad para el componente C5 activado del sistema de complemento **caracterizado porque** reconoce un polipéptido que tiene al menos 80% de homología con el péptido que comprende la región correspondiente a la secuencia 731-740 del componente C5 de complemento humano, teniendo dicho péptido la secuencia KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (SEC ID N° 15) y en el que dicho anticuerpo inhibe la conversión de la cadena de alfa de C5 a C5a y C5b y en el que anticuerpo se produce de forma recombinante y comprendiendo el anticuerpo ambas secuencias de aminoácidos identificadas como SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4 o sus mutaciones conservativas o teniendo el anticuerpo al menos 95% de homología con la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia SEC ID N° 6.
2. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho componente C5 es de mamífero.
3. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 2 en el que dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en: ser humano, ratón, rata, conejo.
4. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** está en forma de cadena sencilla (scFv) que comprende una región variable de la cadena ligera unida covalentemente a una región variable de la cadena pesada.
5. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por** el hecho de que la cadena ligera es una cadena lambda y la región variable de la cadena pesada es la región VH3.
6. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 **caracterizado porque** tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID N° 6.
7. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 5 **caracterizado porque** comprende la secuencia SEC ID N° 6 en combinación con una secuencia derivada de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.
8. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicha región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en: cadena pesada de IgA humana, cadena pesada de IgG humana, cadena gamma pesada murina, cadena pesada de *Rattus norvegicus*.
9. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 8 **caracterizado porque** es dimérico.
10. Proteína quimérica recombinante **caracterizada por** que comprende la secuencia correspondiente a SEC ID N° 6 o una secuencia proteica que tiene al menos 95% de homología con SEC ID N° 6, reconociendo dicha proteína quimérica recombinante un polipéptido que tiene al menos 80% de homología con el péptido que comprende la región correspondiente a la secuencia 731-740 del componente C5 de complemento humano, teniendo dicho péptido la secuencia KDMQLGR↓LHMKTLTPVSK (SEC ID N° 15) y en el que dicha proteína quimérica recombinante inhibe la conversión de la cadena alfa de C5 a C5a y C5b.
11. Secuencias de nucleótidos aisladas que codifican los anticuerpos recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-9.
12. Secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 11 **caracterizada porque** comprende la secuencia SEC ID N° 5.
13. Vectores que comprenden secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11 y 12.
14. Vectores de acuerdo con la reivindicación 13 **caracterizados por** el hecho de ser vectores de expresión en bacterias, levaduras o células eucariotas superiores.
15. Anticuerpos recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 o proteínas de acuerdo con la reivindicación 10 para uso diagnóstico o terapéutico.
16. Secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12 o vectores de acuerdo con las reivindicaciones 13 y 14 para uso terapéutico o diagnóstico.
17. Uso de anticuerpos o proteínas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 15 o secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12 para la preparación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas o agudas.
18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que la enfermedad crónica se selecciona entre: artritis reumatoide, glomerulonefritis, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas desmielinizantes, aterosclerosis.
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 en el que la enfermedad aguda se selecciona de: disfunción de órganos múltiples e infarto de miocardio.
20. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 para la preparación de un medicamento para daño del miocardio de

reperusión después de isquemia.

- 5 21. Composiciones farmacéuticas que comprenden como el principio activo cualquiera de los anticuerpos recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 o de las proteínas de acuerdo con la reivindicación 10 o de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12 en combinación con excipientes y/o diluyentes adecuados.
22. Procedimiento para seleccionar anticuerpos anti-C5 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 dotados con la capacidad de inhibir la formación de C5a a partir de C5, **caracterizado porque** comprende una primera etapa de selección del antígeno C5 y una segunda etapa de selección por medio de inhibición de ensayo hemolítico en glóbulos rojos de oveja (SRBC).
- 10 23. Procedimiento para la preparación de los anticuerpos o proteínas recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-10 **caracterizado porque** se usan secuencias de nucleótidos aisladas de acuerdo con las reivindicaciones 11-12.
- 15 24. Uso de anticuerpos recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 o de secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12 para establecer modelos animales no humanos de enfermedades causadas por hiperactivación del sistema de complemento.
25. Kit que comprende al menos uno de los anticuerpos recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 o al menos una de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12.
- 20 26. Procedimiento para la selección de inhibidores de la conversión del componente C5 de complemento activado a sus fragmentos biológicamente activos, **caracterizado por** el uso de anticuerpos o proteínas recombinantes de acuerdo con las reivindicaciones 1-10.
27. Uso de un péptido que tiene la secuencia KDMQLGR↓LHMKTLIPVSK para la selección de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 1.
28. Animales transgénicos no humanos, **caracterizados por** el hecho de expresar secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12.
- 25 29. Células aisladas **caracterizadas por** transformarse con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 11-12 o por los vectores de acuerdo con las reivindicaciones 13-14.
- 30 30. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por** el hecho de que la cadena ligera es una cadena kappa o Vλ3/V2-14.
- 30 31. Anticuerpo recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por** el hecho de que la cadena ligera es Vκ4/DPK24.
32. Anticuerpo recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 30 y 31, **caracterizado por** el hecho de que la región variable de la cadena pesada es VH3/V-48.