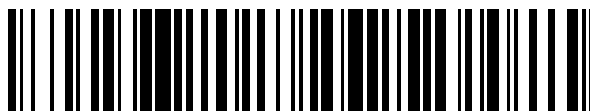


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 134**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2004 E 04732276 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1625166**

54 Título: **Anticuerpos de MASP-2**

30 Prioridad:

**12.05.2003 DK 200300716**

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

**16.07.2015**

73 Titular/es:

**HELION BIOTECH APS (100.0%)  
Egholmvej 10  
2720 Vanløse, DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, FLEMMING y  
WAHLERS, ULLA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 541 134 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 de MASP-2

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos de MASP-2 y a equivalentes funcionales de los mismos. En particular, la invención se refiere a anticuerpos de MASP-2 capaces de inhibir la función de MASP-2. Además, la invención se refiere a métodos para producir dichos anticuerpos, a métodos para inhibir la actividad de MASP-2, así como a las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de MASP-2.

**Antecedentes de la invención**

10 El sistema de complemento comprende un conjunto complejo de enzimas y proteínas no enzimáticas de importancia para la función del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo<sup>1</sup>. Hasta hace poco se conocían dos modos de activación, el mecanismo clásico iniciado por complejos anticuerpo-antígeno y el mecanismo alternativo iniciado por determinadas estructuras sobre superficies microbianas. Se ha descrito un tercer mecanismo nuevo e independiente de anticuerpos para la activación complementaria<sup>2</sup>. Dicho mecanismo se inicia cuando una lectina de unión a manano (MBL, del inglés "mannan-binding lectin", descrita primero como una "proteína" de unión a manano<sup>3</sup>, MBP, véase Ezekowitz, Patente de EE.UU. n° 5.270.199) se une a carbohidratos y se conoce como el mecanismos MBLectin.

15 La MBL está relacionada estructuralmente con el subcomponente C1q del componente C1 del complemento, y parece que la MBL activa el sistema de complemento a través una serina proteasa asociada denominada MASP<sup>4</sup> ó p100<sup>5</sup>, que es similar a los componentes C1 r y C1 s del mecanismo clásico. El nuevo mecanismo de activación de complemento se denomina mecanismo MBLectin. De acuerdo al mecanismo postulado para esta ruta, la MBL se une a estructuras de carbohidrato específicas que se encuentran en la superficie de un rango de microorganismos que incluyen bacterias, levaduras, protozoos parasitarios y virus<sup>5</sup>, y su actividad antimicrobiana procede de la activación de los componentes del mecanismo de complemento líticos terminales<sup>7</sup> o de promover fagocitosis<sup>8</sup>.

20 Las MASPs (serina proteasas asociadas a MBL) son serina proteasas similares en estructura al C1 r y el C1 s del mecanismo de complemento. La MASP-1 tiene una estructura de lazo de histidina del tipo observado en la tripsina y en las serina proteasas similares a la tripsina. Se ha observado que la MASP-1 está implicada en la activación de complemento por MBL. Se ha publicado que un clon de ADNc que codifica MASP-1 que codifica un péptido líder putativo de 19 aminoácidos seguidos de 680 residuos de aminoácido predichos para formar el péptido maduro.

25 La MASP-2 (serina proteasa 2 asociada a MBL)<sup>22</sup> es una serina proteasa también similar en estructura al C1 r y al C1 s del mecanismo de complemento. Como éstos, y al contrario que la MASP1, no presenta estructura de lazo de histidina del tipo observado en la tripsina y en las serina proteasas de tipo tripsina. Se ha observado que la MASP-2 está implicada en la activación de complemento por MBL.

Los anticuerpos de MASP-2 han sido descritos previamente en la técnica.

35 El documento WO 02/06460 describe la MASP-2 humana. El documento describe además anticuerpos de MASP-2 generados inmunizando conejos con los 19 aminoácidos N-terminales de la MASP-2 humana o pollos con los aminoácidos 505 a 523 y los aminoácidos 538 a 556 de la MASP-2 humana.

Petersen et al., 1998, Molecular Immunology, vol. 35, n° 6/7, pág. 409, describe la generación de anticuerpos de MASP-2 usando sistemas de expresión bacterianos. Los anticuerpos reaccionan con MASP-2 en un ensayo TRIFMA y/o Western blot.

**40 Sumario de la invención**

De forma interesante, los inventores de la presente invención han reconocido que la inhibición del mecanismo MBLectin puede ser deseable para el tratamiento de una serie de afecciones clínicas. Sin embargo, los inhibidores específicos del mecanismo MBLectin no están bien caracterizados en la técnica y por tanto existe una necesidad no cubierta de inhibidores específicos.

45 La presente invención describe que los anticuerpos de la parte C-terminal de MASP-2 son capaces de inhibir la actividad de MASP-2 más eficazmente que los anticuerpos de la parte N-terminal de MASP-2. La invención además describe epítomos de MASP-2, donde los anticuerpos que reconocen dichos epítomos son particularmente útiles para inhibir la actividad de MASP-2. Los epítomos preferidos se describen en la presente memoria.

50 En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente y se une a un epítomo de la parte C-terminal de la MASP-2 humana, donde la parte C-terminal de la MASP-2 humana consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1), donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reconoce específicamente al menos parte de un epítomo reconocido por uno o más anticuerpos de referencia seleccionados del grupo que consiste en:

- i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición 03050904;
- ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2657;
- 5 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2660;
- iv. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2658; y
- 10 v. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2659,

donde el anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconocen específicamente y se unen a un epítipo de la parte C-terminal de MASP-2 o a un homólogo funcional del mismo.

15 Además se describe proporcionar polipéptidos aislados que comprenden un fragmento C-terminal de MASP-2, siendo útil dicho polipéptido para activar anticuerpos de epítipos del extremo C de la MASP-2. En particular, los polipéptidos aislados de la parte C-terminal de la MASP-2 o un homólogo funcional del mismo, pueden ser polipéptidos que comprenden o que consisten en:

- 20 i. los dominios de EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa; o
- ii. los dominios de CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa; o
- iii. el dominio de CCP1; o
- iv. el dominio de CCP2; o

el dominio de CCP1 y el de CCP2.

25 También se describe proporcionar métodos para producir un anticuerpo que inhiba la actividad de MASP-2, inmunizando un animal, preferiblemente un mamífero, con polipéptidos aislados que comprenden un fragmento C-terminal de la MASP-2, siendo útil dicho polipéptido para activar anticuerpos de epítipos del extremo C de la MASP-2. En particular, los polipéptidos aislados de la parte C-terminal de la MASP-2 o de un homólogo funcional de la misma, pueden ser polipéptidos que comprenden o que consiste en:

- 30 v. los dominios de EFG, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa; o
- vi. los dominios de CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa; o
- vii. el dominio de CCP1 y el dominio de serina proteasa; o
- viii. el dominio de CCP2 y el dominio de serina proteasa; o
- ix. los dominios de CCP1, CCP2 y de serina proteasa
- x. el dominio de serina proteasa

35 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir un anticuerpo que reconozca específicamente y se una a un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2 humana, donde dicha parte C-terminal de la MASP-2 humana consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1), donde dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4, donde dicho epítipo es un epítipo reconocido por uno o más anticuerpos de referencia seleccionados del grupo que consiste en:

- 40 i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición 03050904;
- ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2657;
- 45 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2660;
- iv. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2658; y
- v. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de deposición DSM ACC2659,

50 comprendiendo dicho método las etapas de administrar a un mamífero la parte C-terminal de la MASP-2, donde la parte C-terminal de la MASP-2 consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1) o un homólogo funcional de los mismos, al menos un 80% homólogo a los mismos, identificar y seleccionar los anticuerpos que reconozcan dicho epítipo y evaluar si dichos anticuerpos son capaces de inhibir la deposición de C4 y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4.

55 Los anticuerpos producidos según el método también se describen en la invención.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar métodos para inhibir la actividad de MASP-2 que comprenden las etapas de:

- 1) Proporcionar una composición que comprende MASP-2;
- 2) Proporcionar un anticuerpo de MASP-2 acorde a la invención;
- 3) Incubar dicha composición con dicho anticuerpo, inhibiendo de ese modo la actividad de MASP-2.

La inhibición de MASP-2 conducirá a la inhibición de la activación de complemento, preferiblemente a la inhibición del mecanismo MBlectin. Por consiguiente, los anticuerpos que inhiben la actividad de MASP-2 pueden usarse para inhibir la activación del mecanismo MBlectin y consecuentemente dichos anticuerpos pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones clínicas que se caractericen por una activación impropia de complemento, preferiblemente una activación impropia del mecanismo MBlectin.

Por lo tanto, la invención también se refiere a métodos para inhibir el mecanismo MBlectin, incluyendo dichos métodos de manera preferible el uso de anticuerpos de MASP-2, capaces de inhibir la actividad de MASP-2.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de MASP-2 o equivalentes funcionales de los mismos que reconozcan un epítipo en la parte C-terminal de la MASP-2 junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un medicamento para el tratamiento de una afección clínica que comprende un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo que reconozca un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2 como ingrediente activo.

También es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos de tratamiento de una afección clínica que comprende la administración a un individuo que lo necesite de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo que reconozca un epítipo del extremo C de la MASP-2.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar usos de anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconozcan un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección clínica en un individuo que lo necesite.

## 25 Descripción de las Figuras

Figura 1: muestra una representación esquemática de MASP-2 que indica los dominios individuales.

Figura 2: muestra un alineamiento de las secuencias humanas de MASP-1, MASP-2, C1r y C1s que indica la presencia de los dominios individuales en MASP-2. Los aminoácidos conservados en las cuatro proteínas están indicados además con asteriscos.

Figura 3: muestra la inhibición de la deposición de C4 en suero completo por un anticuerpo de MASP-2.

Figura 4: muestra la inhibición de la deposición de C4 por diferentes concentraciones de anticuerpo de MASP-2.

Figura 5: muestra un ensayo de deposición de C4. La figura ilustra la inhibición de la deposición de C4 en suero humano usando diferentes anticuerpos anti-MASP-2 purificados.

Figura 6: muestra un montaje de ensayos Western blot contra MASP-2 en suero humano usando 4 anticuerpos diferentes. Se cargó suero humano en cada calle. La figura se ha montado a partir de cuatro ensayos separados de Western blot usando los anticuerpos mostrados en las calles de arriba para la detección.

Figura 7: muestra los resultados de un ELISA competitivo para la determinación de epítipos solapados.

Figura 8: ilustra la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-6cons).

Figura 9: ilustra la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-3consRev).

Figura 10: muestra un alineamiento entre secuencias de la cadena pesada del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-2, 3, 4, 5, 8) junto con las secuencias homólogas identificadas mediante búsquedas BLAST.

Figura 11: muestra el alineamiento entre secuencias de la cadena ligera del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-6, 7, 9, 10) junto con secuencias homólogas identificadas mediante búsquedas BLAST.

**Listado de secuencias**

SEQ ID 1	MASP-2 humana
SEQ ID 2	Parte de la cadena pesada de NimoAb101 que incluye la región variable
SEQ ID 3	Parte de la cadena ligera de NimoAb101 que incluye la región variable
SEQ ID 4	Parte de la cadena pesada de NimoAb101 que incluye la región variable
SEQ ID 5	Parte de la cadena ligera de NimoAb101 que incluye la región variable
SEQ ID 6	CDR1 de la cadena pesada (también designada H1) de NimoAb101
SEQ ID 7	CDR2 de la cadena pesada (también designada H2) de NimoAb101
SEQ ID 8	CDR3 de la cadena pesada (también designada H3) de NimoAb101
SEQ ID 9	CDR1 de la cadena ligera (también designada L1) de NimoAb101
SEQ ID 10	CDR2 de la cadena ligera (también designada L2) de NimoAb101
SEQ ID 11	CDR3 de la cadena ligera (también designada L3) de NimoAb101
SEQ ID 12	Cebador de PCR
SEQ ID 13	Cebador de PCR

**Definiciones**

5 El término “parte C-terminal de la MASP-2” se refiere al extremo C de la MASP-2 que comprende los dominios de EFG, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa, donde la parte C-terminal de la MASP-2 no incluye el dominio de CUB1.

El término “epítopo” se refiere a un sitio específico sobre un compuesto, es decir una proteína a la cual se une específicamente un determinado anticuerpo. Un epítopo puede ser lineal, es decir, un péptido o un péptido puede ser una estructura tridimensional.

**Descripción detallada de la invención****10 Anticuerpos**

Un aspecto de la presente invención es proporcionar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconozcan específicamente y se unan a un epítopo de la parte C-terminal de la MASP-2, o un homólogo funcional de la misma. El epítopo puede ser cualquiera de los epítopos mencionados en la presente memoria.

15 El anticuerpo o equivalente funcional del mismo puede ser cualquier anticuerpo conocido en la técnica, por ejemplo un anticuerpo policlonal o monoclonal derivado de un mamífero o un anticuerpo sintético, tal como un anticuerpo de cadena sencilla o híbridos que comprenden fragmentos de anticuerpo. Adicionalmente, el anticuerpo puede estar constituido por mezclas de anticuerpos monoclonales o de anticuerpos policlonales artificiales. Además, los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, en particular fragmentos de unión a epítopo. Adicionalmente, los anticuerpos o el equivalente funcional de los mismos pueden ser imitaciones de molécula pequeña, que imiten al anticuerpo. Los anticuerpos naturales son moléculas de inmunoglobulina que consisten en cadenas pesadas y ligeras. En las realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

25 Los anticuerpos monoclonales (Mab's) son anticuerpos, donde todas las moléculas de anticuerpo son similares y por tanto reconocen el mismo epítopo. Los anticuerpos monoclonales en general son producidos por una línea celular de hibridoma. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales y células de hibridoma que sintetizan anticuerpos son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, los hibridomas que producen anticuerpos pueden prepararse por fusión de un linfocito B productor de anticuerpos con una línea celular de linfocitos B inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales según la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, como se describe en “Antibodies: A Laboratory Manual”, por Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 30 1988. Dichos anticuerpos monoclonales pueden derivarse de cualquier especie de mamífero adecuada, sin embargo con frecuencia los anticuerpos monoclonales serán anticuerpos de roedor, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón o de rata. Se prefiere que los anticuerpos según la presente invención sean anticuerpos monoclonales o que deriven de anticuerpos monoclonales.

35 Los anticuerpos policlonales son una mezcla de moléculas de anticuerpo que reconocen un antígeno específico dado, por tanto los anticuerpos policlonales pueden reconocer diferentes epítopos dentro de dicho antígeno. En

general, los anticuerpos policlonales se purifican a partir de suero de un mamífero, que previamente ha sido inmunizado con el antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden, por ejemplo, prepararse mediante cualquiera de los métodos descritos en "Antibodies: A Laboratory Manual", por Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988. Los anticuerpos policlonales pueden derivar de cualquier especie de mamífero adecuada, por ejemplo de ratones, ratas, conejos, burros, cabras, ovejas, vacas o camellos. El anticuerpo preferiblemente no deriva de una especie no mamífera, es decir, el anticuerpo por ejemplo preferiblemente no es un anticuerpo de pollo. El anticuerpo también puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal artificial como por ejemplo el descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.789.208 ó 6.335.163.

En una realización de la invención el anticuerpo es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse para atacar moléculas humanas, por ejemplo mediante ingeniería de proteínas, por selección a partir de bibliotecas sintéticas, o por inmunización de ratones transgénicos que portan genes de anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados en general son anticuerpos quiméricos que comprenden regiones derivadas de un anticuerpo humano y regiones derivadas de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor. La humanización (también denominada Reformado o anclaje de CDR) es una técnica bien establecida para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales (mAbs) a partir de fuentes xenogénicas (habitualmente roedores) y para mejorar su activación del sistema inmunitario humano. Estructuras sobre las que anclar las CDRs de roedor. El término "molécula de anticuerpo humanizado" (HAM) se usa en la presente memoria para describir una molécula que tenga un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana, mientras que algunas o todas las partes restantes derivadas de inmunoglobulina de la molécula se derivan de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender: un dominio variable completo procedente de una inmunoglobulina no humana fusionado sobre uno o más dominios constantes humanos; o una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) ancladas sobre regiones estructurales humanas apropiadas en el dominio variable. Un método para humanizar MABs relativo a la producción de anticuerpos quiméricos en el que un sitio de unión a antígeno que comprende los dominios variables completos de un anticuerpo es fusionado con dominios constantes derivados de un segundo anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humano. Los métodos para llevar a cabo dichos procedimientos de quimerización se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A-0 120 694 (Celltech Limited), EP-A-0 125 023 (Genetech Inc.), EP-A-0 171 496 (Res. Dev. Corp. Japón), EP-A-0 173 494 (Universidad de Stanford) y EP-A-0 194 276 (Celltech Limited). Una forma más compleja de humanización de un anticuerpo implica el rediseño del dominio de región variable de tal modo que los aminoácidos que constituyen el sitio de unión de anticuerpo no humano son integrados en la estructura de una región variable de anticuerpo humano (Jones et al., 1986).

Los anticuerpos según la presente invención también pueden ser anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos recombinantes son anticuerpos o fragmentos de los mismos o equivalentes funcionales de los mismos producidos usando tecnología recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos recombinantes se pueden producir usando una biblioteca sintética o por presentación de fagos. Los anticuerpos recombinantes se pueden producir de acuerdo a cualquier método, por ejemplo los métodos descritos en "Recombinant Antibodies", Frank Breitling, Stefan Dübel, Jossey-Bass, septiembre de 1999.

Los anticuerpos según la presente invención también pueden ser anticuerpos biespecíficos, es decir anticuerpos que reconocen específicamente dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos en general se pueden preparar a partir de anticuerpos monoclonales, o a partir de anticuerpos recombinantes, por ejemplo fusionando dos hibridomas a fin de combinar su especificidad, mediante reticulamiento químico o usando tecnologías recombinantes. Los anticuerpos según la presente invención también pueden ser anticuerpos tri-específicos.

Los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden ser, en una realización preferida, un fragmento de un anticuerpo, preferiblemente un fragmento de unión a antígeno o una región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo útiles para la presente invención incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmento Fab, cada uno de ellos con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, llamado así por su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos fragmentos de unión a antígeno que son capaces de reticular antígeno, y otro fragmento residual (que se denomina pFc'). Los fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Tal como se usa en la presente memoria, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos, se refiere a los fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>.

Los fragmentos de anticuerpo preferidos retienen parte o esencialmente toda la capacidad de un anticuerpo para unirse selectivamente con su antígeno o receptor. Algunos fragmentos preferidos se definen como se indica a continuación:

- (1) Fab es el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo. Un fragmento Fab puede ser producido por digestión de anticuerpo entero con la enzima papaína para dar lugar a una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada.

- 5 (2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo y puede obtenerse tratando el anticuerpo entero con pepsina, seguido de reducción, para dar lugar a una cadena ligera intacta y a una porción de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas procedentes de la región bisagra.
- 10 (3) (Fab')<sub>2</sub> es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo entero con la enzima pepsina sin la posterior reducción. F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' que están unidos por dos enlaces de disulfuro.
- 15 (4) Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación íntima no covalente (dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Es en esta configuración en la que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDRs específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

20 En una realización de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla (SCA, del inglés "single chain antibody"), definido como una molécula diseñada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, ligada a un ligando de polipéptido adecuado tal como una molécula de cadena única fusionada genéticamente. Dichos anticuerpos de cadena única también se denominan fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla o scFv (del inglés "single-chain Fv"). Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligando de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión de antígeno.

25 El anticuerpo también puede seleccionarse para tener propiedades útiles, por ejemplo, puede ser deseable controlar la vida media en suero del anticuerpo. En general, las moléculas de anticuerpo completas tienen una persistencia en suero muy larga, mientras que los fragmentos (<60-80 kDa) son filtrados muy rápidamente a través del riñón. La glicosilación en anticuerpos completos en general, prolonga la persistencia en suero. Por tanto, si se desea una acción a largo plazo del anticuerpo de MASP-2, el anticuerpo de MASP-2 preferiblemente es un anticuerpo completo, mientras que si se desea una acción más corta del anticuerpo de MASP-2, podría ser preferible un fragmento de anticuerpo.

30 En otra realización de la presente invención el equivalente funcional de un anticuerpo es una imitación de molécula pequeña, que imita a un anticuerpo.

35 Los anticuerpos preferidos dentro del alcance de la presente invención son anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos capaces de inhibir la función de MASP-2. La actividad de MASP-2 puede ser la actividad de serina proteasa de MASP-2, tal como la actividad de serina proteasa para C4 y/o C2. En particular, los anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos capaces de inhibir la actividad de serina proteasa de la MASP-2 son preferibles. Incluso más preferibles son los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos capaces de inhibir la deposición de C4 de complejos MBL-MASP-2. Los anticuerpos de acuerdo a la presente invención aún más preferidos son anticuerpos, o los equivalentes funcionales de los mismos, capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo. Otros anticuerpos o sus equivalentes funcionales aún más preferidos son capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo de individuos con actividad de deposición de C4. Los ensayos útiles para determinar la deposición de C4 se describen más adelante en la presente memoria.

45 Adicionalmente, los anticuerpos preferidos son anticuerpos, o los equivalentes funcionales de los mismos, capaces de inhibir la deposición de C2 de complejos MBL-MASP-2. Los anticuerpos según la presente invención aún más preferidos son anticuerpos, o sus equivalentes funcionales, capaces de inhibir la deposición de C2 en suero completo. Los anticuerpos aún más preferidos, o los equivalentes funcionales de los mismos, son capaces de inhibir la deposición de C2 en suero completo de individuos con actividad de deposición de C2. Los ensayos útiles para determinar la deposición de C2 se describen más adelante en la presente memoria.

50 Por lo tanto, los anticuerpos preferidos o los equivalentes funcionales de los mismos son capaces de inhibir la deposición de C4 y/o C2 en suero completo hasta menos del 50%, tal como menos del 40%, por ejemplo menos del 30%, tal como menos del 25%, por ejemplo menos del 20%, tal como menos del 15%, por ejemplo menos del 10%, tal como menos del 5% de la deposición de C4 de control. Preferiblemente, el anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo hasta menos del 30%, preferiblemente hasta menos del 25%, más preferiblemente hasta menos del 20%, incluso más preferiblemente hasta menos del 15%, aún más preferiblemente hasta menos del 10%. Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos preferidos son capaces de inhibir la deposición de C2 en suero completo hasta menos del 30%, preferiblemente menos del 25%, más preferiblemente menos del 20%, incluso más preferiblemente menos del 15%, incluso más preferiblemente menos del 10%.

En una realización muy preferida de la invención, el anticuerpo se selecciona del grupo de anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma depositadas bajo el número de acceso 03050904. Además, los equivalentes funcionales pueden ser fragmentos, preferiblemente fragmentos de unión de dichos anticuerpos.

5 En una realización de la presente invención el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprende regiones hipervariables específicas, designadas CDR. Preferiblemente las CDRs son CDRs según la definición de CDR de Kabat. Las CDRs o regiones hipervariables, por ejemplo, pueden identificarse mediante alineamiento de secuencia con otros anticuerpos. Preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprende al menos uno, más preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente las tres CDRs de cadena pesada siguientes:

- 10 1. H1 del DWE16140-4 con indicado en la Figura 10 (SEQ ID 6);
2. H2 del DWE16140-4 con indicado en la Figura 10 (SEQ ID 7);
3. H3 del DWE16140-4 con indicado en la Figura 10 (SEQ ID 8).

15 Más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprende una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es homóloga o idéntica en al menos en un 95%, más preferiblemente en al menos 98%, incluso más preferiblemente al menos un 99% respecto a la SEQ ID 4. Aún más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprenden una cadena pesada que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID 4.

20 Incluso más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprende una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es homóloga o idéntica en al menos un 95%, incluso más preferiblemente en al menos un 98%, incluso más preferiblemente en al menos un 99% respecto a la SEQ ID 2. Aún más preferiblemente, la cadena pesada consiste en la secuencia DWE16140-4 de la Figura 10.

25 Se puede determinar el % de homología tal como se describe en la presente memoria para homólogos funcionales de la MASP-2. Lo más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprenden una cadena pesada que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID 2. Preferiblemente, dicho anticuerpo o equivalente funcional del mismo es capaz de reconocer específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo designado NimoAb101.

En otra realización de la presente invención, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprende regiones hipervariables específicas, designadas CDR. Preferiblemente, las CDRs son CDRs según la definición de CDR de Kabat. Preferiblemente, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprende al menos una, más preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente las tres CDRs de cadena ligera siguientes:

- 30 4. L1 del DWE16140-10 con indicado en la Figura 11 (SEQ ID 9);
5. L2 del DWE16140-10 con indicado en la Figura 11 (SEQ ID 10);
6. L3 del DWE16140-10 con indicado en la Figura 11 (SEQ ID 11);

35 Más preferiblemente, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprende una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es homóloga o idéntica en al menos un 95%, más preferiblemente en al menos un 98%, incluso más preferiblemente al menos un 99% respecto a la SEQ ID 5. Aún más preferiblemente, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprende una cadena ligera que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID 5.

40 Incluso más preferiblemente, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprenden una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es homóloga o idéntica en al menos un 95%, aún más preferiblemente en al menos el 98%, incluso más preferiblemente en al menos un 99% respecto a la SEQ ID 3. El % de homología puede determinarse como se describe en la presente memoria para homólogos funcionales de MASP-2. Más preferiblemente, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprenden una cadena ligera que comprende o que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID 3. Aún más preferiblemente, la cadena ligera consiste en la secuencia DWE16140-10 con de la Figura 10. Preferiblemente, dicho anticuerpo o equivalente funcional del mismo son capaces de reconocer específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo designado como NimoAb101.

45 En una realización preferida, el anticuerpo o equivalente funcional del mismo comprende las CDRs de la cadena pesada y las CDRs de la cadena ligera descritas en la presente memoria anteriormente. Más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprenden la región variable de la cadena pesada descrita anteriormente y la región variable de la cadena ligera descrita anteriormente. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo comprenden la cadena pesada descrita anteriormente en la presente memoria y la cadena ligera descrita anteriormente en la presente memoria.

50 Por tanto, en una realización muy preferida la invención se refiere a un anticuerpo que comprende uno o más, preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente al menos 3, incluso aún más preferiblemente al menos 4, incluso más preferiblemente al menos 5, incluso más preferiblemente las 6 CDRs seleccionadas del grupo que consiste en:



- 1) CDR1 de la cadena pesada de la SEQ ID 6;
- 2) CDR2 de la cadena pesada de la SEQ ID 7;
- 3) CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID 8;
- 4) CDR1 de la cadena ligera de la SEQ ID 9;
- 5) CDR1 de la cadena ligera de la SEQ ID 10; y
- 6) CDR1 de la cadena ligera de la SEQ ID 11.

o un equivalente funcional de las mismas. Este anticuerpo además, preferiblemente es capaz de inhibir la actividad de MASP-2 y/o es capaz de reconocer específicamente un epítipo de MASP-2 tal como se describe más adelante en la presente memoria.

## 10 Epítopos y péptidos de MASP-2

La proteína MASP-2 comprende una serie de dominios, a saber, los dominios CUB1, EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y de serina proteasa. En la Figura 1 se muestra una presentación esquemática de la MASP-2. La posición de los dominios individuales dentro de la MASP-2 humana se indica en la Figura 2. Se cree que el dominio responsable de la asociación con MBL está situado en el extremo N, mientras que el dominio de serina proteasa es responsable de la actividad de serina proteasa de la MASP-2. Sorprendentemente, los anticuerpos activados para el extremo C de la MASP-2 son más eficientes en la inhibición de la actividad de MASP-2 en suero completo que otros anticuerpos de MASP-2.

Los anticuerpos funcionales y los equivalentes funcionales de los mismos según la presente invención reconocen específicamente un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2. "Reconocen específicamente" significa que el anticuerpo se une a dicho epítipo con una afinidad significativamente mayor que cualquier otra molécula o parte de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo solo se une a dicho epítipo según se detecta mediante Western blot o ELISA. Para asegurar que el anticuerpo reconoce específicamente un epítipo dentro de un fragmento dado de MASP-2, se puede usar dicho fragmento como antígeno durante la generación de dicho anticuerpo. Es preferible en la presente invención que el antígeno de MASP-2 usado para la inmunización sea más grande de 18 aminoácidos, por ejemplo que tenga una longitud de al menos 20, tal como al menos 25, por ejemplo al menos 30 aminoácidos. A modo de ejemplo, si el anticuerpo debiera reconocer un epítipo dentro los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa, se podría usar un péptido que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa como antígeno durante la generación de dicho anticuerpo.

Preferiblemente, el anticuerpo o el equivalente funcional del mismo reconocen específicamente un epítipo dentro de la parte C-terminal de MASP-2, donde la parte C-terminal comprende o incluso más preferiblemente consiste en los dominios de EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa. En una realización de la invención, la parte C-terminal de la MASP-2 comprende o preferiblemente consiste en los dominios de CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa. En otra realización de la presente invención, la parte C-terminal de MASP-2 comprende o preferiblemente consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa. En otra realización adicional de la invención, la parte C-terminal de MASP-2 comprende o consiste en los dominios de CCP2 y serina proteasa. En una realización preferida de la invención, la parte C-terminal de la MASP-2 comprende o preferiblemente consiste en el dominio de serina proteasa.

En otra realización adicional de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o preferiblemente que consiste en el dominio de CCP1. En otra realización adicional de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o preferiblemente que consiste en el dominio de CCP2. En otra realización adicional de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o preferiblemente que consiste en los dominios de CCP1 y CCP2.

Por el término "MASP-2" se entiende cualquier molécula de MASP-2 conocida por el especialista en la técnica. Dicha MASP-2, por ejemplo, puede derivar de un mamífero, por ejemplo la MASP-2 puede derivar de un ser humano. En una realización preferida de la presente invención, la MASP-2 es MASP-2 humana tal como se identifica por la SEQ ID 1, o un homólogo funcional de la misma que comparta al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 80%, aún más preferiblemente al menos un 90%, incluso aún más preferiblemente al menos un 95% de homología o, más preferiblemente, de identidad con respecto a la SEQ ID 1. En una realización muy preferida de la invención, la MASP-2 es una MASP-2 de SEQ ID 1.

Por lo tanto, en una realización preferida el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 136 a 686 de la SEQ ID 1, o un equivalente funcional del mismo, puesto que dicho fragmento comprende los dominios de EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa de la MASP-2 humana.

En otra realización de la invención el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 183 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Por tanto, dicho fragmento comprende los dominios de CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa de la MASP-2 humana.

En otra realización adicional de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 293 a 362 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Dicho fragmento comprende el dominio de CCP1 de la MASP-2 humana.

5 En una realización adicional de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 293 a 431 de la SEQ ID 1 o un homólogo funcional del mismo. Dicho fragmento comprende los dominios de CCP1 y CCP2 de la MASP-2 humana.

En otra realización adicional de la presente invención dicho anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 363 a 431 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Dicho fragmento comprende el dominio de CCP2 de la MASP-2 humana.

10 En una realización aún más adicional de la presente invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Dicho fragmento comprende los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa de la MASP-2 humana.

15 En otra realización adicional de la presente invención el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 363 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Dicho fragmento (=CCP2, serina proteasa).

En una realización incluso aún más adicional, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 445 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo. Dicho fragmento comprende el dominio de serina proteasa de la MASP-2 humana.

20 En una realización de la presente invención, el epítipo no se encuentra dentro de los aminoácidos 505 a 523 y los aminoácidos 538 a 556 de la SEQ ID 1.

25 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que preferiblemente consiste en los aminoácidos 363 a 385, tal como del 370 al 390, por ejemplo del 380 al 400, tal como del 390 al 410, por ejemplo del 400 al 420, tal como del 410 al 430, por ejemplo del 420 al 440, tal como del 430 al 450, por ejemplo del 440 al 460, tal como del 450 al 470, por ejemplo del 460 al 480, tal como del 470 al 490, por ejemplo del 480 al 500, tal como del 490 al 510, por ejemplo del 500 al 520, tal como del 510 al 530, por ejemplo del 520 al 540, tal como del 530 al 550, por ejemplo del 540 al 560, tal como del 550 al 570, por ejemplo del 560 al 580, tal como del 570 al 590, por ejemplo del 580 al 600, tal como del 590 al 610, por ejemplo del 600 al 620, tal como del 610 al 630, por ejemplo del 620 al 640, tal como del 630 al 650, por ejemplo del 640 al 660, tal como del 650 al 670, por ejemplo del 660 al 686 de la SEQ ID 1, donde dicho fragmento como mucho comprende 100, preferiblemente como mucho 80, más preferiblemente como mucho 60, incluso más preferiblemente como mucho 40 aminoácidos.

30

35 En otra realización preferida, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2, que comprende o consiste preferiblemente en los aminoácidos 400 a 420, tal como del 410 al 430, por ejemplo del 420 al 440, tal como del 430 al 450, por ejemplo del 440 al 460, tal como del 450 al 470, por ejemplo del 460 al 480, tal como del 470 al 490, por ejemplo del 480 al 500, tal como del 490 al 510, por ejemplo del 500 al 520, tal como del 510 al 530, por ejemplo del 520 al 540, tal como del 530 al 550 de la SEQ ID 1, donde dicho fragmento como mucho comprende 100, preferiblemente como mucho 80, más preferiblemente como mucho 60, incluso más preferiblemente como mucho 40 aminoácidos.

40 En otra realización preferida adicional, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que preferiblemente consiste en los aminoácidos 410 a 430, por ejemplo del 420 al 440, tal como del 430 al 450, por ejemplo del 440 al 460 de la SEQ ID 1, donde dicho fragmento como mucho comprende 100, preferiblemente como mucho comprende 80, más preferiblemente como mucho 60, incluso más preferiblemente como mucho 40 aminoácidos.

45 En otra realización muy preferida, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de MASP-2 que comprende o que preferiblemente consiste en los aminoácidos 420 a 440 ó los aminoácidos 430 a 450.

50 En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconocen específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma designada M0545YM035.

En otra realización preferida de la presente invención, los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconocen específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma designada M0545YM029.

En otra realización preferida de la presente invención, los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconocen específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma designada M0545YM046.

5 En otra realización preferida de la presente invención, los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconocen específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma designada M0545YM048.

En una realización especialmente preferida de la presente invención, los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconocen específicamente el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904.

10 En particular, los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904 y las líneas celulares de hibridoma designadas M0545YM029 y M0545YM035 reconocen epítipos solapados. Por tanto, se prefiere que los anticuerpos o los equivalentes funcionales de los mismos reconozcan específicamente un epítipo o parte del mismo reconocido por uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

- 15
- el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
  - la línea celular de hibridoma designada M0545YM029; y
  - la línea celular de hibridoma designada M0545YM035.

Según la presente invención, cuando un anticuerpo dado reconoce al menos parte de un epítipo reconocido por otro anticuerpo dado, se dice que dichos dos anticuerpos reconocen el mismo epítipo o epítipos solapados.

20 Se pueden usar diferentes ensayos disponibles para la persona especialista en la técnica para determinar si un anticuerpo (también denominado anticuerpo de ensayo) reconoce el mismo epítipo o un epítipo solapado como un anticuerpo monoclonal particular (también designado anticuerpo de referencia). Preferiblemente, el ensayo implica las etapas de:

- 25
- Proporcionar MASP-2 o un fragmento de la misma que comprende el epítipo reconocido por el anticuerpo de referencia.
  - Añadir el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia a dicha MASP-2, donde el anticuerpo de ensayo o el anticuerpo de referencia están marcados con una etiqueta detectable. Alternativamente, ambos anticuerpos pueden estar marcados con diferentes etiquetas detectables.
  - Detectar la presencia de la etiqueta detectable en la MASP-2.
- 30
- Detectar con ello si el anticuerpo de ensayo puede desplazar al anticuerpo de referencia.

Si el anticuerpo de referencia es desplazado, el anticuerpo de ensayo reconoce al mismo epítipo o a un epítipo solapado como el anticuerpo de referencia. Así, si el anticuerpo de referencia está marcado con una etiqueta detectable, entonces una señal detectable baja en la MASP-2 es indicativa de desplazamiento del anticuerpo de referencia. Si el anticuerpo de ensayo está marcado con una etiqueta detectable, entonces una señal detectable elevada en la MASP-2 es indicativa de desplazamiento del anticuerpo de referencia. El fragmento de MASP-2 puede inmovilizarse preferiblemente sobre un soporte sólido que permita un fácil manejo. La etiqueta detectable puede ser cualquier etiqueta detectable directa o indirectamente, tal como una enzima, un isótopo radiactivo, un metal pesado, un compuesto coloreado o un compuesto fluorescente. En el ejemplo 5 de la sección "ELISA competitivo de MASP-2" de la presente memoria, se describe un método muy preferido para determinar si un anticuerpo de ensayo reconoce el mismo epítipo o un epítipo solapado como anticuerpo de referencia. El especialista en la técnica puede adaptar fácilmente dicho método a los anticuerpos particulares en cuestión.

También es un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos de MASP-2 aislados útiles como antígenos para la generación de anticuerpos de MASP-2, en particular anticuerpos de MASP-2 capaces de inhibir la actividad de MASP-2 en suero completo. Dichos polipéptidos pueden, por ejemplo, usarse para inmunizar a un animal a fin de generar anticuerpos de los polipéptidos.

Se puede usar cualquier polipéptido de MASP-2 C-terminal con la presente invención, sin embargo los polipéptidos preferidos son polipéptidos aislados que comprenden o más preferiblemente que consisten en los dominios de EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa de la MASP-2. Por lo tanto, un polipéptido de MASP-2 muy preferido según la invención comprende o incluso más preferiblemente consiste en los aminoácidos 136 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo.

En otra realización, el polipéptido de MASP-2 comprende o preferiblemente consiste en los dominios de CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa. Por tanto, un polipéptido de MASP-2 preferido comprende o consiste en los aminoácidos 183 a 686 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo.

En otra realización adicional de la presente invención, el polipéptido de MASP-2 aislado comprende o preferiblemente consiste en el dominio de CCP1. Por tanto, un polipéptido preferido comprende o incluso más preferiblemente consiste en los aminoácidos 293 a 362 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo.

5 En otra realización adicional de la presente invención, el polipéptido de MASP-2 aislado comprende o preferiblemente consiste en el dominio de CCP2. Por tanto, el polipéptido puede comprender o incluso más preferiblemente consistir en los aminoácidos 363 a 431 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo.

En una realización adicional de la invención, el polipéptido de MASP-2 aislado comprende o preferiblemente consiste en los dominios de CCP1 y CCP2. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender o incluso consistir en los aminoácidos 293 a 431 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional del mismo.

10 Los polipéptidos de MASP-2 C-terminales preferiblemente tienen una longitud de como mucho 570 aminoácidos, por ejemplo los polipéptidos pueden tener una longitud en el intervalo de 20 a 570 aminoácidos, tal como de 30 a 500, por ejemplo de 50 a 400, tal como de 100 a 300, por ejemplo de 150 a 250 aminoácidos.

15 Los equivalentes funcionales o los homólogos funcionales de polipéptidos de MASP-2 o de sus fragmentos que comprenden una secuencia de aminoácidos predeterminada, por ejemplo un fragmento de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID 1, se definen como polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos capaz de ser reconocida por un anticuerpo que también es capaz de reconocer la secuencia de aminoácidos predeterminada. Los términos "equivalente funcional" y "homólogo funcional" se usan en la presente memoria de forma intercambiable.

20 Los homólogos funcionales según la presente invención comprenden polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, que comparten homología con las secuencias de polipéptido de MASP-2 predeterminadas, tal como se han descrito en la presente memoria. Por ejemplo, dichos polipéptidos tienen al menos aproximadamente un 40 por ciento de homología, tal como al menos aproximadamente un 50 por ciento de homología, por ejemplo al menos aproximadamente un 60 por ciento de homología, tal como al menos aproximadamente un 70 por ciento de homología, por ejemplo al menos aproximadamente un 75 por ciento de homología, tal como al menos aproximadamente un 80 por ciento de homología, por ejemplo al menos aproximadamente un 85 por ciento de homología, tal como al menos aproximadamente un 90 por ciento de homología, por ejemplo al menos un 92 por ciento de homología, tal como al menos un 94 por ciento de homología, por ejemplo al menos un 95 por ciento de homología, tal como al menos un 96 por ciento de homología, por ejemplo al menos un 97 por ciento de homología, tal como al menos un 98 por ciento de homología, por ejemplo al menos un 99 por ciento de homología con respecto a las secuencias de polipéptido predeterminadas tal como se han descrito previamente en la presente memoria.

30 La homología preferiblemente se puede calcular mediante cualquier algoritmo o implementación por ordenador de tales algoritmos, por ejemplo CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics ó GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG). La homología entre secuencias de aminoácidos se puede calcular además con la ayuda de matrices bien conocidas, tales como por ejemplo una cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85 y BLOSUM 90.

40 Los homólogos funcionales según la presente invención preferiblemente son polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50 por ciento, preferiblemente al menos aproximadamente un 60 por ciento, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70 por ciento, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 75 por ciento, aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 80 por ciento, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 85 por ciento, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 por ciento, incluso más preferiblemente al menos un 95 por ciento de homología, lo más preferiblemente al menos un 98 por ciento de identidad con las secuencias de polipéptidos de MASP-2 predeterminadas, tal como se han descrito previamente en la presente memoria.

45 Los homólogos funcionales pueden comprender una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una sustitución de un aminoácido por cualquier otro aminoácido. Por ejemplo, dicha sustitución puede ser una sustitución de aminoácidos conservativa o puede ser una sustitución no conservativa. Preferiblemente, dichas sustituciones son sustituciones conservativas.

50 Una sustitución de aminoácidos conservativa es una sustitución de un aminoácido dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos por otro aminoácido dentro del mismo grupo, donde los aminoácidos dentro de grupos predeterminados exhiben características similares o sustancialmente similares. Dentro del significado del término "sustitución de aminoácidos conservativa" tal como se aplica en la presente memoria, un aminoácido puede estar sustituido por otro que esté dentro de los grupos de aminoácidos que se caracterizan por tener:

- 55
- i) cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys)
  - ii) cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)
  - iii) cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
  - iv) cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
  - v) cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)

- vi) cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
- vii) cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
- viii) cadenas laterales de amida (Asn, Gln)
- ix) cadenas laterales de hidroxilo (Ser, Thr)
- 5 x) cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met), y
- xí) aminoácidos que son ácidos monoamino-dicarboxílicos o ácidos monoamino-monocarboxílico-monamidocarboxílicos (Asp, Glu, Asn, Gln).

La adición o la eliminación de un aminoácido pueden ser una adición o una eliminación de entre 2 y 5 aminoácidos, tal como entre 5 y 10 aminoácidos, por ejemplo entre 10 y 20 aminoácidos, tal como entre 20 y 50 aminoácidos. Sin embargo, las adiciones o eliminaciones de más de 50 aminoácidos, tales como adiciones de entre 50 y 200 aminoácidos, también se contemplan en la presente invención.

Además de los compuestos de polipéptido descritos en la presente memoria, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura peptídica y dichos compuestos también pueden usarse del mismo modo que los péptidos de la invención. Esto puede lograrse mediante técnicas de modelización y diseño químico conocidas por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear la esterificación y otras alquilaciones para modificar el extremo amino de, p.ej., una estructura peptídica de di-arginina, para imitar una estructura de tetrapéptido. Cabe destacar que todas dichas construcciones estéricamente similares entran dentro del alcance de la presente invención.

En la presente invención también se contemplan péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales. Los equivalentes funcionales también comprenden conjugados glicosilados y covalentes o agregativos, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Dichos equivalentes funcionales se preparan por enlace de funcionalidades a grupos presentes en el fragmento, que incluyen uno cualquiera, o ambos, de los extremos N y C, empleando los medios conocidos en la técnica.

Los equivalentes funcionales pueden, por tanto, comprender fragmentos conjugados a ésteres o amidas alifáticas o de acilo de los extremos carboxi, alquilaminas o residuos que contienen cadenas laterales de carboxilo, p.ej., conjugados de alquilaminas en residuos de ácido aspártico; derivados de O-acilo de residuos que contienen grupos hidroxilo y derivados de N-acilo de los residuos que contienen aminoácidos aminoterminalmente o grupos amino, p.ej., conjugados con Met-Leu-Phe. Los derivados de los grupos acilo se seleccionan a partir del grupo de restos alquilo (que incluyen normal alquilo C3 a C10), formando de este modo especies de alcanilo, y compuestos carbocíclicos o heterocíclicos, formando de este modo especies de aroilo. Los grupos reactivos preferiblemente son compuestos difuncionales conocidos per se para su uso en el reticulado de proteínas con matrices insolubles a través de grupos laterales reactivos.

Los homólogos funcionales puede además ser un polipéptido codificado por un ácido nucleico que sea capaz de hibridarse con la cepa complementaria de una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de polipéptido de MASP-2 predeterminadas, tal como se han descrito anteriormente en la presente memoria en condiciones de severidad.

Las condiciones de severidad tal como se usan en la presente memoria denotan la severidad aplicada normalmente en relación a ensayos de Southern blot y de hibridación tal como se describe, p.ej., en Southern E.M., 1975, J. Mol. Biol. 98: 503-517. Para dicho propósito, es una práctica rutinaria incluir las etapas de prehibridación e hibridación. Dichas etapas normalmente se llevan a cabo usando disoluciones que contienen 6x SSPE, 5% de Denhardt, 0,5% de SDS, 50% de formamida, 100 µg/mL de ADN de testículo de salmón desnaturalizado (incubación durante 18 h a 42°C), seguido de lavados con 2x SSC y SDS al 0,5% (a temperatura ambiente y a 37°C), y un lavado con 0,1x SSC y SDS al 0,5% (incubación a 68°C durante 30 minutos), tal como describen Sambrook et al., 1989, en "Molecular Cloning/A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor).

El(los) epítomos reconocido(s) por un anticuerpo específico puede(n) determinarse mediante cualquier método convencional, por ejemplo métodos que impliquen el uso de espectrometría de masas. Los ejemplos no limitantes de métodos de mapeado de epítomos usando espectrometría de masas incluyen:

1. Baerga-Ortiz, A, Hughes, CA, Mandell, JG, Komives, EA: Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D- exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein. *Protein Sci.* 11: 1300-1308, 2002.
2. Hochleitner, EO, Borchers, C, Parker, C, Bienstock, RJ, Tomer, KB: Characterization of a discontinuous epitope of the human immunodeficiency virus (HIV) core protein p24 by epitope excision and differential chemical modification followed by mass spectrometric peptide mapping analysis.
3. Hochleitner, EO, Gorny, MK, Zolla-Pazner, S, Tomer, KB: Mass spectrometric characterization of a discontinuous epitope of the HIV envelope protein HIV-gp120 recognized by the human monoclonal antibody 1331A. *J. Immunol.* 164: 4156-4161, 2000.
4. Parker, CE, Tomer, KB: MALDI/MS-based epitope mapping of antigens bound to immobilized antibodies. *Mol. Biotechnol.* 20: 49-62, 2002.

5. Peter, JF, Tomer, KB: A general strategy for epitope mapping by direct MALDI-TOF mass spectrometry using secondary antibodies and cross-linking. *Anal. Chem.* 73: 4012-4019, 2001.
6. Van De, WJ, Deininger, SO, Macht, M, Przybylski, M, Gershwin, ME: Detection of molecular determinants and epitope mapping using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85: 229-235, 1997.
7. Yu, L, Gaskell, SJ, Brookman, JL: Epitope mapping of monoclonal antibodies by mass spectrometry: identification of protein antigens in complex biological systems. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 208-215, 1998.
8. Zhao, Y, Chalt, BT: Protein epitope mapping by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66: 3723-3726, 1994.

## 10 Métodos de preparación de anticuerpos de MASP-2

Los anticuerpos y los equivalentes funcionales de los mismos pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido por los especialistas en la técnica.

Un método para producir un anticuerpo que reconozca específicamente y se una a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2 comprende la etapa de administrar a un mamífero la parte C-terminal de la MASP-2 o un fragmento de la misma o un homólogo de la misma. Dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento de la misma u homólogo de la misma puede ser cualquiera de los fragmentos y péptidos de MASP-2 descritos anteriormente en la presente memoria. En particular, el fragmento de MASP-2 puede ser cualquiera de los fragmentos de MASP-2 descritos anteriormente en la presente memoria, donde dichos fragmentos comprendan un epítipo. La parte C-terminal de la MASP-2 o el fragmento de la misma o el homólogo de la misma administrada a dicho mamífero también se designa en la presente memoria como "antígeno de MASP-2".

En una realización, la presente invención se refiere a métodos para producir un anticuerpo capaz de inhibir la actividad de MASP-2, donde dicho anticuerpo reconoce específicamente un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2.

El antígeno de MASP-2 preferiblemente tiene una longitud de al menos 18 aminoácidos, más preferiblemente de al menos 20, incluso más preferiblemente de al menos 25 aminoácidos.

El antígeno de MASP-2 se puede administrar a dicho mamífero más de una vez, tal como dos veces, por ejemplo 3 veces, tal como entre 3 y 5 veces, por ejemplo de 5 a 10 veces, tal como entre 10 y 20 veces, por ejemplo de 20 a 50 veces, tal como más de 50 veces. También es posible que se administren diferentes antígenos de MASP-2 al mismo mamífero, tanto simultánea como secuencialmente en cualquier orden.

En general, el antígeno de MASP-2 estará en una disolución o suspensión acuosa antes de la administración. Adicionalmente, el antígeno de MASP-2 puede mezclarse con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, el antígeno de MASP-2 puede mezclarse con uno o más adyuvantes adecuados y/o con uno o más vehículos.

Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla con un antígeno administrado incremente o modifique de cualquier otro modo la respuesta inmune frente a dicho antígeno. Los adyuvantes, por ejemplo, pueden seleccionarse del grupo que consiste en  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ , sílice, alúmina,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , caolín, carbón, hidróxido de aluminio, dipéptidos de muramilo, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-nomuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominada nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominada MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween-80®, lipopolisacáridos y sus diversos derivados, que incluyen lípido A, Adyuvante Completo de Freund (FCA), Adyuvantes Incompletos de Freund, Adyuvante Merck 65, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de Mycobacterium, tuberculosis, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*, liposomas u otras emulsiones de lípidos, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse las patentes de EE.UU. n° 58767 y 5.554.372), derivados de Lípido A, derivados de coleratoxina, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices de péptidos sintéticas o GMDP, Interleucina 1, Interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos para su uso con la invención incluyen el Adyuvante Completo de Freund (FCA), los Adyuvantes Incompletos de Freund.

Los vehículos son estructuras de sostén, p.ej., un polipéptido o un polisacárido, a las cuales un antígeno es capaz de asociarse. Independientemente de la presencia de un adyuvante puede haber presente un vehículo. La función de un vehículo, por ejemplo, puede ser aumentar el peso molecular de un antígeno de MASP-2 particular a fin de aumentar la inmunogenicidad, para conferir estabilidad, para aumentar la actividad biológica, o para aumentar la vida media en suero. El vehículo puede ser cualquier vehículo adecuado conocido por los especialistas en la técnica, por ejemplo, una proteína o una célula que presenta antígeno. Una proteína vehículo podría ser, aunque sin limitación, la hemocianina de lapa de ojo de cerradura, proteínas de suero tales como transferrina, albúmina de suero bovino, albúmina de suero humano, tiroglobulina u ovoalbúmina, inmunoglobulinas, u hormonas, tales como la insulina o el ácido palmítico.

El antígeno de MASP-2 puede administrarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, parenteralmente, oralmente o tópicamente. Preferiblemente, sin embargo, el antígeno se administra mediante inyección, por ejemplo,

inyección intramuscular, intradérmica, intravenosa o subcutánea, más preferiblemente mediante inyección subcutánea o intravenosa.

5 El mamífero puede ser cualquier mamífero adecuado. Los anticuerpos monoclonales frecuentemente se preparan usando un roedor, por ejemplo los anticuerpos policlonales de ratón o de rata se pueden preparar administrando el antígeno de MASP-2 a cualquier mamífero, por ejemplo ratones, ratas, conejos, burros, cabras, ovejas, vacas o camellos. Los anticuerpos según la invención también pueden ser mezclas de anticuerpos, tales como mezclas de anticuerpos monoclonales, mezclas de anticuerpos policlonales o ambas. Por tanto, también se contempla dentro de la invención que se puede usar más de un tipo de animal.

10 Si el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, las células productoras de anticuerpos normalmente se aíslan a partir de dicho mamífero tras la inmunización. El método puede comprender, por ejemplo, las etapas de aislar células productoras de anticuerpos a partir de dicho mamífero, preparar células de hibridoma a partir de dichas células productoras de anticuerpos, cultivar dichos hibridomas y aislar anticuerpos producidos por dichos hibridomas.

15 Por ejemplo, dichas células se pueden aislar a partir de dicho mamífero 1 día, tal como en el intervalo de 2 a 10 días, por ejemplo en el intervalo de 10 a 20 días, tal como en el intervalo de 20 a 40 días, por ejemplo en el intervalo de 1 a 3 meses, tal como en el intervalo de 3 a 6 meses, por ejemplo en el intervalo de 6 a 12 meses, tal como en el intervalo de 12 a 24 meses, por ejemplo más de 24 meses después de la primera administración del antígeno de MASP-2.

Las células productoras de antígeno en general son células B y dichas células pueden, por ejemplo, aislarse a partir de dicho mamífero por escisión del bazo de dicho mamífero.

20 Una vez que las células productoras de anticuerpos han sido aisladas a partir de dicho mamífero, las células pueden fusionarse con otras células a fin de obtener células de hibridoma. Dichas células pueden ser, por ejemplo, células de cáncer, tales como células derivadas de una leucemia, por ejemplo células de mieloma. Tras la fusión, dichas células de hibridoma se pueden cultivar usando protocolos de cultivo estándar. El medio de cultivo (sobrenadante) puede evaluarse para determinar la presencia de anticuerpos de MASP-2 adecuados y se pueden seleccionar y cultivar las células de hibridoma capaces de producir anticuerpos de MASP-2 adecuados.

25 La evaluación se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo métodos que detecten la presencia de anticuerpos capaces de asociarse con el antígeno de MASP-2. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, el análisis de transferencia Western, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima), tinción de puntos o TRIFMA. Adicionalmente o alternativamente, dicho medio de cultivo puede ser evaluado para determinar la presencia de anticuerpos de MASP-2 capaces de inhibir la actividad de MASP-2. A continuación se describen en la presente memoria los ensayos adecuados para determinar la actividad de MASP-2.

30 Una vez que se han identificado las células de hibridoma capaces de producir anticuerpos MASP-2 adecuados, dichas células se pueden cultivar usando cualquier protocolo estándar y los anticuerpos producidos por dichas células pueden purificarse. La purificación de anticuerpos puede realizarse usando cualquier protocolo estándar, por ejemplo una purificación con anticuerpos anti-Ig, proteína G o proteína A.

35 Si el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, dicho anticuerpo puede, por ejemplo, purificarse directamente a partir del suero de un mamífero, inmunizado con el antígeno de MASP-2. La purificación se puede realizar usando cualquier método estándar, por ejemplo una purificación con anticuerpos anti-Ig, proteína G o proteína A.

40 Los métodos de preparación de los anticuerpos monoclonales, de las mezclas de anticuerpos monoclonales o de los anticuerpos policlonales se describen, por ejemplo, en "Antibodies: A Laboratory Manual", de Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988.

Un ejemplo no limitante de un método para preparar anticuerpos según la presente invención se describe más adelante en la presente invención en el Ejemplo 1.

Dependiendo de la naturaleza del anticuerpo, se pueden emplear otros métodos.

45 En una realización de la invención, el anticuerpo puede producirse usando métodos recombinantes, por ejemplo ingeniería de proteínas o a través de escrutinio de bibliotecas. Las bibliotecas pueden ser bibliotecas sintéticas o bibliotecas que comprenden material natural. Un método útil es la presentación de fagos. En general, la presentación de fagos implica el escrutinio de una o más bibliotecas de fagos que codifican un anticuerpo útil o un equivalente funcional del mismo.

50 En otra realización de la presente invención, los métodos implican el uso de animales, por ejemplo, roedores, tales como ratones modificados genéticamente para producir anticuerpos quiméricos o anticuerpos de otras especies, por ejemplo anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden inmunizar animales transgénicos, tales como ratones transgénicos, que portan genes de anticuerpo procedentes de otras especies, tales como genes de anticuerpos humanos, con cualquier pf de los fragmentos de MASP-2 mencionados anteriormente.

Los fragmentos de anticuerpo pueden producirse por fragmentación de los anticuerpos según la invención usando cualquier método conocido por el especialista en la técnica. Los métodos incluyen, aunque sin limitación, la digestión con una o más proteasas, por ejemplo papaína o pepsina, así como la reducción o una combinación de ambas.

**Actividad de inhibición de MASP-2**

5 La presente invención también se refiere a métodos para inhibir la actividad de la MASP-2. En particular, los métodos pueden implicar las etapas de:

- 1) Proporcionar una composición que comprende MASP-2;
- 2) Proporcionar un anticuerpo de MASP-2 según la invención;
- 3) Incubar dicha composición con dicho anticuerpo, inhibiendo de ese modo la actividad de MASP-2.

10 La composición puede ser cualquier composición que comprenda MASP-2, por ejemplo suero. El anticuerpo de MASP-2 preferiblemente es un anticuerpo de MASP-2 capaz de inhibir la actividad de MASP-2.

**Ensayos para detectar la actividad de MASP-2**

15 La actividad de MASP-2 puede determinarse mediante cualquier ensayo adecuado. Los ensayos útiles incluyen ensayos particulares, donde se evalúa la actividad de serina proteasa de los complejos MASP-2/MBL. Los ensayos preferidos son los ensayos que determinan la inhibición de la deposición de C2 y/o C4.

Los ensayos pueden implicar las etapas de preparar una superficie sólida sobre la cual se inmoviliza un agente de asociación a MBL, la unión de complejos MBL/MASP-2 a dicho agente de asociación a MBL y el escrutinio de la inhibición de reacciones catalizadas por MASP-2.

20 La superficie sólida puede ser cualquier superficie sólida útil, por ejemplo pocillos de microtitulación. El agente de asociación a MBL puede ser cualquier compuesto al cual se una MBL con una elevada afinidad, por ejemplo anticuerpos de MBL, manano o manosa, sin embargo preferiblemente es manano. Los complejos MBL/MASP-2 pueden derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, puede ser MBL recombinante, MASP-2 recombinante o MBL y/o MASP-2 purificadas a partir de suero. La MBL/MASP-2 recombinante puede ser MBL/MASP-2 de longitud completa o fragmentos funcionales de las mismas. Además, la MBL/MASP-2 recombinante puede estar unida a uno  
25 o más compuestos adicionales, tales como etiquetas genéticas. La MBL y/o la MASP-2 pueden derivar de cualquier especie adecuada, por ejemplo pueden ser MBL/MASP-2 humanas. En una realización de la invención, los complejos MBL/MASP-2 se obtienen de suero completo y no se purifican antes de llevar a cabo el ensayo. Dichos ensayos a continuación evalúan la inhibición de la deposición de sustrato, es decir C4 en suero completo. La reacción catalizada por MASP-2 preferiblemente es la deposición de C2 y/o C4.

30 El anticuerpo o el equivalente funcional del mismo que va a ser escrutado en función de su actividad de inhibición se añaden al MBL/MASP-2 ligado. El anticuerpo puede haber sido purificado o puede ser, por ejemplo, sobrenadante de cultivo celular de hibridoma sin purificar. También se llevan a cabo preferiblemente controles sin añadir anticuerpo. El anticuerpo se puede añadir en concentraciones en el intervalo de 1 µg/mL a 500 µg/mL, preferiblemente en el intervalo de 5 µg/mL a 400 µg/mL, más preferiblemente en el intervalo de 10 µg/mL a 300  
35 µg/mL, incluso más preferiblemente en el intervalo de 15 µg/mL a 200 µg/mL, aún más preferiblemente en el intervalo de 20 a 100 µg/mL.

Se añade un sustrato de MASP-2 a los complejos MBL/MASP-2. Preferiblemente, dicho sustrato es C2 ó C4, o una mezcla de ambos. El sustrato puede ser producido recombinante o puede ser un sustrato derivado de suero. El sustrato puede haber sido purificado antes de ser usado o no, pero preferiblemente se purifica. A fin de monitorizar  
40 la deposición, el sustrato puede ser marcado con una etiqueta detectable, por ejemplo con una enzima, un compuesto radiactivo, un compuesto fluorescente, un colorante, un metal pesado, un compuesto quimioluminiscente u otro similar.

Sin embargo, es preferible que la deposición sea detectada usando un agente de unión específico, tal como un anticuerpo, que reconozca específicamente el sustrato digerido. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos que reconozcan el complemento humano C4c. Dichos anticuerpos pueden marcarse con una etiqueta detectable directa  
45 o indirectamente. Por ejemplo, con una enzima, un compuesto radiactivo, un compuesto fluorescente, un colorante, un metal pesado, un compuesto quimioluminiscente o un compuesto de afinidad. Los compuestos de afinidad incluyen, por ejemplo, otros anticuerpos o biotina, estreptavidina.

Los métodos mencionados anteriormente pueden llevarse a cabo en cualquier orden útil, es decir, el sustrato se puede añadir antes o simultáneamente al anticuerpo inhibidor, los complejos de MBL/MASP-2 pueden mezclarse  
50 con el sustrato y/o el anticuerpo inhibidor antes de la inmovilización sobre una superficie sólida, etc. Las etapas también pueden llevarse a cabo en el orden descrito.

Si los complejos MBL/MASP-2, el sustrato y el anticuerpo se mezclan antes de la inmovilización, entonces dicha mezcla puede preincubarse durante un tiempo dado, por ejemplo la preincubación puede estar en el rango de 5



minutos a 2 horas. En general, el MBL/MASP-2, el sustrato y el anticuerpo se premezclan cuando los complejos MBL/MASP-2 están presentes en el suero y no han sido purificados previamente a partir del suero.

En una realización preferida de la presente invención, se determina la actividad de MASP-2 usando cualquiera de los métodos descritos en los ejemplos 2 y 3. En particular, los anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4 deberían ser capaces preferiblemente de inhibir la deposición de C4 en al menos uno, preferiblemente en ambos, de los métodos descritos en los Ejemplos 2 y 3. Los anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4, más preferiblemente deberían al menos ser capaces de inhibir la deposición de C4 de acuerdo a los métodos descritos en el Ejemplo 2, mientras que los anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo deberían ser capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo tal como se describe en el Ejemplo 3.

## 10 Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas

En una realización de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y los equivalentes funcionales de los mismos según la invención. La invención se refiere además a medicamentos para el tratamiento de una afección clínica que comprende el anticuerpo, los métodos de tratamiento de una afección clínica que comprende la administración de dicho anticuerpo o el uso de dicho anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección clínica.

La afección clínica puede ser cualquiera de las afecciones mencionadas más adelante en la presente memoria. El individuo que necesite la administración de anticuerpos de MASP-2 puede ser cualquier individuo que padezca dicha afección o que esté en riesgo de adquirir dicha afección clínica. Preferiblemente, el individuo es un ser humano.

El tratamiento puede ser curativo, paliativo, de alivio y/o un tratamiento profiláctico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden preferiblemente una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo que reconozcan específicamente un epítipo dentro del extremo C de la MASP-2 (designado anteriormente, y más adelante, en la presente memoria "anticuerpo de MASP-2"). Una cantidad farmacéuticamente eficaz es una cantidad de anticuerpo de MASP-2 que induce la respuesta deseada en un individuo que reciba dicha composición farmacéutica.

La cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo de MASP-2 depende del individuo al cual debería administrarse, en particular del tamaño de dicho individuo así como de la afección clínica y el modo específico de administración. Sin embargo, en general, el anticuerpo de MASP-2 debería administrarse a un ser humano adulto, por dosis, en el rango de 1 mg a 5000 mg, preferiblemente en el rango de 10 mg a 3000 mg, más preferiblemente en el rango de 50 mg a 1000 mg, por ejemplo en el rango de 100 mg a 750 mg, tal como en el rango de 150 mg a 500 mg, por ejemplo en el rango de 200 mg a 400 mg, tal como en el rango de 250 mg a 350 mg, por ejemplo alrededor de 300 mg.

La composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferiblemente, dichas composiciones incluyen disoluciones de inyección esterilizadas acuosas y no acuosas que pueden contener reactivos humectantes o emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponantes de pH, compuestos bacteriostáticos y solutos que hacen isotónica a la formulación con el fluido corporal, preferiblemente la sangre, del individuo; y las suspensiones esterilizadas acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. La composición farmacéutica puede presentarse en dosis unitarias o en recipientes multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales selladas, y se puede almacenar en una condición sometida a secado por congelación que solo requiera la adición del vehículo líquido esterilizado inmediatamente antes de su uso.

Preferiblemente, la composición de la presente invención comprende uno o más excipientes farmacéuticos aceptables, que podrían ser esterilizadas o no esterilizadas, para uso con células, tejidos u organismos, tales como un excipiente farmacéutico adecuado para su administración a un individuo. Dichos excipientes pueden incluir, aunque sin limitación, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de dichos excipientes en varias cantidades. La formulación debería ajustarse al modo de administración. La invención se refiere además a un kit farmacéutico de partes que comprenden uno o más recipientes rellenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente. Los ejemplos de excipientes no acuosos son el propileno glicol, polietileno glicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan en una forma que es inyectable, como disoluciones o suspensiones líquidas; además, las formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en un líquido antes de ser inyectadas también entran dentro del alcance de la presente invención. La preparación se puede emulsionar o el determinante inmunogénico, así como las colectinas y/u homólogos de colectina según la presente invención, se puede encapsular en liposomas.

El anticuerpo de MASP-2 puede administrarse solo o en combinación con otros compuestos, tanto simultáneamente como secuencialmente en cualquier orden.

Por ejemplo, la administración podría ser por inyección o infusión parenteral, infusión rápida, absorción nasofaríngea, absorción dérmica, y enteralmente, tal como por administración oral. La inyección parenteral podría, por ejemplo, ser una inyección intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Preferiblemente, dicha administración se realiza parenteralmente mediante inyección o infusión.

5 El anticuerpo de MASP-2 debería administrarse tan a menudo como fuera requerido, puesto que el anticuerpo de MASP-2 puede administrarse más de una vez, tal como al menos dos veces, por ejemplo al menos 3 veces, tal como al menos 4 veces, por ejemplo al menos 5 veces, tal como en el intervalo de 1 a 100 veces, por ejemplo en el intervalo de 1 a 50 veces, tal como en el intervalo de 1 a 25 veces, por ejemplo en el intervalo de 1 a 10 veces.

10 Preferiblemente, hay al menos 1 día entre 2 administraciones, tal como al menos 2 días, por ejemplo al menos 3 días, tal como al menos 5 días, por ejemplo al menos una semana, tal como al menos 2 semanas, por ejemplo al menos un mes, tal como al menos 6 meses, por ejemplo al menos 1 año, tal como al menos 2 años, por ejemplo al menos 3 años, tal como al menos 5 años, por ejemplo al menos 10 años.

### Afecciones clínicas

15 La afección clínica según la presente invención puede ser cualquier afección, que puede ser tratada con fines curativos, paliativos o profilácticos mediante la administración de anticuerpos de MASP-2.

La afección clínica puede ser, en una realización preferida de la presente invención, una enfermedad inflamatoria crónica. Las enfermedades inflamatorias crónicas pueden ser, por ejemplo, afecciones inflamatorias autoinmunes.

20 Las afecciones inflamatorias autoinmunes (también designadas "trastornos autoinmunes" en la presente memoria) pueden dividirse de forma general entre aquellas que están restringidas principalmente a órganos o tejidos específicos y aquellas que afectan a todo el organismo. Los ejemplos de trastornos específicos de órganos (con el órgano afectado) incluyen la esclerosis múltiple (recubrimiento de mielina en procesos nerviosos), diabetes mellitus tipo I (páncreas), tiroiditis de Hashimoto (glándula tiroidea), anemia perniciosa (estómago), enfermedad de Addison (glándulas adrenales), miastenia gravis (receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular), artritis reumatoide (recubrimiento de articulaciones), uveítis (ojos), soriasis (piel), Síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas) y enfermedad de Grave (tiroides). Las enfermedades autoinmunes sistémicas incluyen el lupus sistémico eritematoso, la glomeronefritis y la dermatomiositis.

25

En una realización de la presente invención, la afección clínica preferida se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide y lupus sistémico eritematoso.

30 Otros ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen asma, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, otras dermatitis eccematosas, dermatitis seborreica, rinitis, liquen plano, pénfigo, penfigoide ampolloso, epidermolísis bullosa, urticaria, angioedemas, vasculitis, eritemas, eosinofilia cutánea, alopecia areata, aterosclerosis, cirrosis biliar primaria y síndrome nefrótico. Las enfermedades relacionadas incluyen inflamaciones intestinales, mastocitosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, así como alergias relacionadas con los alimentos.

35 En otra realización de la presente invención, la afección clínica se caracteriza por una pérdida masiva de células, por ejemplo debido a apoptosis o necrosis. Dicha necrosis o apoptosis puede ser inducida por una serie de factores diferentes.

40 En una realización preferida de la invención, la afección clínica es isquemia/lesión por reperfusión. La isquemia puede originarse por varias causas diferentes, por ejemplo tras una apoplejía, un infarto de miocardio, una cirugía mayor o un trasplante de órganos. Por lo tanto, la afección clínica puede ser isquemia/lesión por reperfusión provocada, por ejemplo, por apoplejía, infarto de miocardio, cirugía mayor o trasplante de órganos.

45 Por tanto, la afección clínica puede ser isquemia/lesión por reperfusión, que es resultado de PTCA (angioplastia coronaria transluminal percutánea) o CABG (injerto de bypass de arteria coronaria). Además, la afección clínica puede ser isquemia/lesión por reperfusión, que es el resultado de un infarto agudo de miocardio o una isquemia cerebral.

### Ejemplo

#### Ejemplo 1

*Anticuerpo anti-MASP-2 monoclonal:*

50 Se inyectó subcutáneamente a ratas Wistar hembra (de 8 semanas de edad) con 3 µg de dominio de CCP1-CCP2-serina proteasa de MASP-2 humana recombinante (CCP1/2-SP) (Rossi et al., 2001) emulsificada en adyuvante completo de Freund, y se repitió tres veces con 3 µg de CCP1/2-SP en adyuvante de Freund incompleto. Tres días antes de la extracción del bazo, las ratas fueron tratadas intravenosamente con 3 µg de CCP1/2-SP en salino. La fusión de una suspensión de células de bazo con células de mieloma (X63-Ag8.653) y el cultivo sobre células alimentadoras de ratón se realizó tal como se describe (Liu et al., 2001). Para la detección de un anticuerpo anti-

MASP-2 en los sobrenadantes, se recubrieron placas de microtitulación (FluoroNunc, Nunc, Kamstrup, Dinamarca) con 1 µg de manano (Nakajima y Ballou, 1974) en 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM, pH 9,6 (tampón de recubrimiento) durante una noche a 4 °C. Los sitios de unión de proteína residuales fueron bloqueados con 200 µg de albúmina de suero humano (HSA) en 200 µL de Tris-HCl 10 mM, NaCl 140 mM, NaN<sub>3</sub> 1,5 mM, pH 7,4 (TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los pocillos fueron lavados en TBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (v/v) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM (TBS/Tw/Ca<sup>2+</sup>) seguido de incubación durante una noche a 4 °C con 0,5 µg de preparación MBL/MASP en 100 µL de TBS/Tw/Ca<sup>2+</sup>.

Tras el lavado, los sobrenadantes de hibridoma diluidos 1:5 en TBS/Tw/Ca<sup>2+</sup> fueron añadidos a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpo anti-MASP-2 ligados fueron detectados añadiendo 50 ng de anticuerpo de Ig de rata anti-conejo (Dako, Glostrup, Dinamarca) marcado con europio (Perkin Elmer, Gaithersburg, EE.UU.) (Hemmila et al., 1984) en 100 µL de TBS/Tw, EDTA 25 µM. Tras 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados y se detectó el europio ligado mediante la adición de 200 µL de disolución potenciadora (Perkin Elmer), y registrando la fluorescencia resuelta en el tiempo en un fluorómetro DELFIA® (Perkin Elmer). Los cultivos positivos seleccionados fueron clonados dos veces mediante dilución limitante y se congelaron en DMEM al 60% (v/v), suero fetal de ternero al 30% (v/v), DMSO al 10% (v/v).

Se separó una preparación de MBL/MASP en SDS-PAGE seguido de la tinción sobre una membrana de PVDF. Los anticuerpos seleccionados fueron evaluados para determinar el reconocimiento de MASP-2 en la mancha.

Los anticuerpos inhibidores fueron identificados mediante escrutinio en términos de inhibición de la deposición de C4 catalizada por MASP-2, tal como se describe más adelante en la presente memoria en el Ejemplo 2.

El sobrenadante del cultivo de las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos seleccionados fue centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se tamponó con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7. Se hicieron pasar cien mL de sobrenadante a través de una columna de Ig anti-bovina de 1 mL (5 mg de Ig anti-bovina (Dako) por mL de partículas de Sepharose 4B activadas con CNBr (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia)) equilibrada en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4 (PBS) con EDTA 10 mM (PBS/EDTA). El efluente se hizo pasar por una columna de Sepharose de proteína G de 1 mL (Amersham Bioscience) pre-lavada con glicina 0,1 M, pH 2,5 y se re-equilibró con PBS/EDTA. Las columnas fueron lavadas con 30 mL de PBS/EDTA y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,5. El eluato se recogió en fracciones de 0,5 mL en 40 µL de Tris-HCl 1 M, pH 8,5.

## Ejemplo 2

### Ensayo de inhibición de deposición de C4 catalizada por MASP-2:

El ensayo consta de tres etapas 1) preparación de pocillos de microtitulación recubiertos de manano, 2) unión de rMBL y rMASP-2 a los pocillos recubiertos de manano, 3) escrutinio de inhibición de la deposición de C4 catalizada por MASP-2.

1) Preparación de pocillos de microtitulación recubiertos de manano:

Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos (FluroNunc, Nalgene Nunc Int., Dinamarca) con manano (10 mg/L, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) en un tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 3,18 g/L; NaHCO<sub>3</sub>: 5,86 g/L; pH ajustado a 9,6 usando HCl) durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavan dos veces en TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH ajustado a 7,4 usando HCl). A continuación se bloquean los pocillos mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón como el anterior excepto que se añade 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca). Los pocillos se lavan 3 veces en TBST+Ca<sup>2+</sup> (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Tween 20 0,05%, pH ajustado a 7,4 usando HCl, a partir de aquí, tampón de lavado) y ya están listos para usarse.

2) Unión de rMBL y rMASP-2 a pocillos recubiertos de manano:

0,8 ng/pocillo de MASP-2 marcada con His humana purificada recombinante y 1 ng/pocillo de MBL humana purificada recombinante son ligados a los pocillos de microtitulación recubiertos de manano mediante incubación durante una noche a 4 °C en el anterior tampón de lavado excepto que se añade 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca). Los pocillos son lavados a continuación 3 veces con tampón de lavado y quedan listos para usarse.

3) Escrutinio de inhibición de deposición de C4 catalizada por MASP-2:

La sustancia que va a ser escrutada para inhibición de actividad (p.ej. sobrenadante de cultivo celular de hibridoma, anticuerpo purificado) se añade a rMBL/rMASP-2 unido a pocillos de microtitulación recubiertos de manano en el anterior tampón de lavado, excepto que se añade 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan 3 veces en tampón de lavado y se incuban 1,5 h a 37°C con componente C4 de complemento humano purificado (aproximadamente

1,5-2 ng/mL) en un tampón de barbital sódico (5 mM), NaCl (181 mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM), pH 7,4, 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca) son añadidos antes del uso. Los pocillos se lavan 3 veces con tampón de lavado y se añaden 0,89 mg/L de componente C4c de complemento anti-humano de conejo biotilado (Dako, Dinamarca, biotilado según los procedimientos estándar). Los pocillos son incubados durante 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Se añade estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) a una concentración de 0,1 mg/L en el anterior tampón de lavado excepto que se omite el calcio y se incluye EDTA 50 µM. Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Los pocillos se desarrollan añadiendo 100 µL de Disolución Potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se hace el recuento de los pocillos en un contador Wallac Victor 2<sup>d</sup> Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

Se observa la inhibición a través de la disminución del recuento en comparación con pocillos en los que no se añade sustancia inhibidora.

### Ejemplo 3

#### Ensayo de inhibición de deposición de C4 catalizada por MASP-2 en suero completo:

La muestra de suero que va a analizarse se diluye 250 veces (concentración final) en el anterior tampón de barbital y se añade C4 (1,5-2 ng/mL, concentración final). Se añade la sustancia que va a ser escrutada en relación a la actividad de inhibición (p.ej. el anticuerpo purificado) y las muestras se incuban entre 5 minutos y 2 horas a 37°C. Normalmente, la incubación es de 15 minutos. Se añaden 100 µL a pocillos de microtitulación recubiertos de manano preparados como se ha descrito antes y se incuban 1h½ a 37°C. Los pocillos se lavan 3 veces en el anterior tampón de lavado y se añaden 0,89 mg/L de componente C4c de complemento anti-humano de conejo biotilado (Dako, Dinamarca, biotilado según procedimientos estándar). Los pocillos se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Se añade estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) en una concentración de 0,1 mg/L en el anterior tampón de lavado excepto que se omite el calcio y se incluye EDTA 50 µM. Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Los pocillos se desarrollan añadiendo 100 µL de disolución potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se someten a recuento con un contador Wallac Victor 2<sup>d</sup> Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

La Figura 3 ilustra los recuentos de Eu3 obtenidos tras llevar a cabo el ensayo de inhibición usando el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada con el n° 03050904, PBS ó manosa. El anticuerpo es capaz de inhibir en gran medida la deposición de C4 en todos los sueros evaluados.

La Figura 4 ilustra la inhibición de la deposición de C4 en suero completo por el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada con el n° 03050904 en función de la concentración de anticuerpo.

### Ejemplo 4

#### Composición farmacéutica

Una dosis unitaria de una composición farmacéutica según la invención puede comprender 300 mg de anticuerpo de MASP-2 producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904, purificado como se describe en el Ejemplo 1, y formulado en tampón Tris 10 mM, pH 7,4 y NaCl 140 mM.

La composición farmacéutica se filtra a través de un filtro Planova 75N y un filtro Planova 35N para eliminar cualquier virus, y se filtra en condiciones estériles a través de un filtro de 0,22 µm.

Esta formulación es adecuada para administración parenteral a un humano adulto.

### Ejemplo 5

#### Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón anti-huMASP-2 inhibidores

##### Inmunización

Se inmunizaron cuatro ratones (de 6-8 semanas de edad). Se administró un total de cuatro inyecciones (50 µg de antígeno por animal e inyección). Los ratones fueron inyectados en el día 0 con partes iguales (v/v) de adyuvante completo de Freund y 10 µg de MASP-2 humana marcada con His (N039-76C). Las tres inyecciones siguientes se llevaron a cabo con partes iguales (v/v) de adyuvante incompleto de Freund y antígeno, con tres semanas entre inyecciones. El ratón que mejor respondía 10 días después de la última inyección se seleccionó usando un ensayo ELISA contra MASP-2.

50

Hibridación, fusión

Las fusiones se llevaron a cabo usando una metodología convencional. Los linfocitos esplénicos del animal que mejor respondía se fusionaron con la línea celular Sp2/O-Ag-14 usando PEG (polietilén glicol), y los hibridomas resultantes fueron sembrados en placas de 96 pocillos en medio HAT.

- 5 Se cambió el medio 2-3 veces antes del escrutinio. Normalmente, las colonias de hibridoma estaban preparadas para escrutinio en 3-5 semanas. Los sobrenadantes fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpo inhibidor mediante el ensayo de deposición de C4. Los hibridomas fueron sub-clonados mediante dilución limitante.

- 10 Se escrutaron 785 clones primarios en relación a la actividad de inhibición y se seleccionaron 50 clones inhibidores para subclonación. Los subclones fueron escrutados para inhibición y los clones que mostraron la mayor actividad inhibidora fueron subclonados nuevamente. Tras 2 a 3 subclonaciones, quedaron 4 clones inhibidores de interés (véase la Tabla 1 de la presente memoria).

Ensayo de inhibición de deposición C-4

Tampón B1/HSA: un tampón de barbital sódico (5 mM), NaCl (181 mM), CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM), pH 7,4. Se añadió antes de uso 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca).

- 15 El ensayo consta de tres etapas: 1) preparación de pocillos de microtitulación recubiertos con manano, 2) preincubación de anticuerpo con suero humano, 3) medida de la deposición de C4 catalizada por MASP-2.

Preparación de pocillos de microtitulación recubiertos de manano:

- 20 Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos (FluroNunc, Nalgen Nunc Int., Dinamarca) con manano (10 mg/L, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) en un tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 3,18 g/L; NaHCO<sub>3</sub>: 5,86 g/L; pH ajustado a 9,6 usando HCl) durante una noche a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 2 veces en TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,4 usando HCl). A continuación los pocillos son bloqueados por incubación durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón como el anterior excepto que se añade 1 mg/mL de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhagen, Dinamarca). A continuación los pocillos son lavados 3 veces en TBST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%, pH = 7,4 usando HCl) y ya están listos para uso.

- 25 Preincubación de anticuerpos con suero humano:

- 30 Los anticuerpos que van a ser evaluados son diluidos en serie en B1/HSA. Se transfieren 100 µL para cada dilución a un pocillo de una placa de superficie Nucleon de 96 pocillos. Se añaden 100 µL de suero humano completo diluido x125 (final 250x) a cada pocillo junto con componente C4 de complemento humano purificado (aprox. 3-4 mg/L). Se incuba a 37°C 15 minutos. Entonces se transfieren 100 µL de la mezcla de anticuerpo-suero humano a las placas recubiertas de manano preparadas previamente.

Medida de la deposición de C4 catalizada por MASP-2:

- 35 A continuación las placas recubiertas de manano se incuban 1,5h a 37°C. Los pocillos se lavan 3 veces en tampón de lavado TBST + Ca (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH = 7,4 usando HCl) y se añaden 0,89 mg/L de componente C4c de complemento anti-humano de conejo biotilado diluido en TBST + Ca (Dako, Dinamarca, biotilado según los procedimientos estándar). Los pocillos se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Se añade estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) a una concentración de 0,1 mg/L en el anterior tampón de lavado excepto que se omite el calcio y se incluye EDTA 50 µM. Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Los pocillos se desarrollan añadiendo 100 µL de disolución potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se someten a recuento en un contador Wallac Victor 2d Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

Análisis Western blot

- 45 Se hizo correr suero humano (0,15 µL/calle) sobre geles de NuPage 4-12% Bis-Tris poliacrilamida y se transfirió a una membrana de PVDF. Las manchas se bloquearon con gelatina al 0,5% en tampón de incubación (5X: Tris 250 mM; NaCl 750 mM; EDDTA 25 mM; IGEPAL al 0,5% CA-630, pH 7,4) y se incubaron con los anticuerpos monoclonales, seguido de IgG anti-ratón de conejo conjugado a HRP (DAKO Po260). Las manchas fueron detectadas con el kit quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Inc.).

ELISA competitivo de MASP-2

- 50 Tampón de recubrimiento: PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH = 7,2 usando NaOH).

Tampón de bloqueo: TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,4 usando HCl) que contiene 1 mg/mL de HSA.

Tampón de lavado: TBST + Ca (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH = 7,4 usando HCl).

Recubrimiento de placa ELISA:

5 El antígeno de MASP-2 se diluye hasta 1 µg/mL en tampón de recubrimiento [PBS, pH 7,2]. Se añaden 100 µL de disolución de recubrimiento de MASP-2 a cada pocillo de la placa de microtitulación. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa de microtitulación se vacía y todos los pocillos de la placa se rellenan con tampón de bloqueo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de microtitulación se vacía y cada pocillo se rellena con tampón de lavado. Se vacía la placa de microtitulación. Esto se repite tres veces. Los pocillos se rellenan con tampón de lavado y se almacenan a 4°C.

10 Los anticuerpos de ratón se diluyen apropiadamente (0,2 y 1,0 µg/mL final) con tampón de lavado biotinilado. El NimoAb101 se diluye (0,2 µg/mL final) en tampón de lavado. Los anticuerpos de ratón diluidos se añaden (100 µL/pocillo) a la placa recubierta de MASP-2. La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de microtitulación se vacía.

15 La placa de microtitulación se lava rellorando completamente los pocillos con tampón de lavado y vaciando. Esta etapa se repite dos veces para un total de tres lavados.

20 La estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) se añade a una concentración de 0,1 mg/L en el anterior tampón de lavado, excepto que se omite el calcio y se incluye EDTA 50 µM. Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente. La placa de microtitulación se vacía y los pocillos se lavan tres veces con tampón de lavado. Los pocillos se desarrollan añadiendo 100 µL de disolución potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se someten los pocillos a recuento en un contador Wallac Victor 2d Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

Resultados

La Tabla 1 indica cuatro hibridomas que producen anticuerpos inhibidores identificados como se ha descrito anteriormente.

25 **Tabla 1**

Nombre de NimoAb	ID de hibridoma	Nombre trivial
NimoAb104	M0545YM035	035
NimoAb108	M0545YM029	029
NimoAb109	M0545YM046	046
NimoAb110	M0545YM048	048

Potencia de los nuevos anticuerpos

30 Los cuatro clones de hibridoma descritos se transformaron en crecimiento libre de suero y los anticuerpos fueron purificados a partir del sobrenadante de cultivo mediante purificación MEP HyperCel. La capacidad para inhibir el mecanismo de lectina en un suero humano completo fue determinada mediante el ensayo de deposición de C4, tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 5.

35 A partir de los datos, se puede concluir que el anticuerpo (035) es al menos 3,9 veces más potente que el NimoAb101 en la inhibición de la actividad de MASP-2, mientras que el anticuerpo (029) es al menos 30 veces más potente. El anticuerpo de control (002) es un anticuerpo no inhibidor obtenido durante el escrutinio que lo más probablemente se une al extremo N de la MASP-2. Los anticuerpos (046) y (048) también inhiben, aunque son menos potentes que el NimoAb101.

Mapeado de epítipo

Análisis Western blot:

40 Se llevaron a cabo análisis Western con el objetivo de distinguir entre la unión de los anticuerpos a la cadena A N-terminal (parte de dimerización y unión a MBL) o a la cadena B C-terminal (parte de serina proteasa de la MASP-2). Se hizo correr suero humano sobre SDS-PAGE reducido y se llevó a cabo la inmunodetección con los cuatro anticuerpos por separado. La MASP-2 no activada de longitud completa exhibirá una banda de 74 kDa, la cadena A y la cadena B exhibe bandas de 47 kDa y 27 kDa, respectivamente. La Figura 6 muestra los resultados de los análisis de Western blot contra MASP-2 en suero humano usando los diferentes anticuerpos de ratón.

Se puede concluir a partir de los análisis que los cuatro anticuerpos reconocen una banda de 27 kDa (cadena B), mientras que la cadena A (47 kDa) no se pudo detectar. Por tanto, los cuatro anticuerpos reconocen un epítipo lineal de la cadena B.

ELISA competitivo

- 5 Con el objetivo de elucidar si los anticuerpos comparten el mismo epítipo que el anticuerpo de rata NimoAb101, hemos llevado a cabo un ELISA competitivo. El ELISA se dirigió hacia MASP-2 marcada con His recombinante usando un NimoAb101 biotinilado que compite contra dos concentraciones diferentes (0,2 y 1,0 µg/mL) de los anticuerpos de ratón.

- 10 Los resultados se muestran en la Figura 7. Cuanto mejor compite un anticuerpo con el NimoAb101, menor será la señal de EU3+. Por tanto, se puede concluir que los anticuerpos 029 (NimoAb108) y 035 (NimoAb104) compiten muy bien con el anticuerpo NimoAb101, y por tanto deben compartir al menos parte del epítipo.

### Ejemplo 6

#### Identificación y clonación de la región VH y VL del anticuerpo NimoAb101 expresado en células de hibridoma depositadas bajo el nº de acceso ECACC 03050904

- 15 La especificidad de los anticuerpos reside en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs, del inglés "complementarity determining regions") de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras. Con el objetivo de caracterizar el anticuerpo monoclonal NimoAb101, se clonaron las regiones variables de los dominios VH y VL.

#### Abreviaturas usadas

V<sub>H</sub> = región variable de la cadena pesada de Ig; V<sub>L</sub> = región variable de la cadena ligera de Ig;

- 20 CDR = región determinante de la complementariedad; CDR1, CDR2 y CDR3 = tres regiones tanto en V<sub>H</sub> como en V<sub>L</sub>, que se numeran desde el extremo amino;

FR = región de estructura; FR3 = tercera región de estructura tanto en V<sub>H</sub> como en V<sub>L</sub>, numerada a partir del extremo amino;

scFv = fragmento Fv de cadena sencilla;

- 25 ADNc (ADN complementario) = una molécula de ADN de cadena sencilla que es complementaria en secuencia de bases a una cadena de ARN;

5'RACE = amplificación rápida del extremo 5' de ADNc.

#### Materiales y métodos

##### Aislamiento de ARN total y de ARNm

- 30 Las células de hibridoma de la línea celular depositadas bajo el número ECAAC 03050904 fueron dispensadas en 4 tubos. Las células fueron peletizadas y el sobrenadante se eliminó.

Dos de los tubos se congelaron a -80°C.

- 35 Dos de los tubos se usaron para purificación de ARN usando el kit de ARN total de mamífero GenElute™ RTN70. La concentración de ARN fue determinada espectrofotométricamente. El ARN total también se purificó usando el la purificación de ARN total con el kit NucleoSpin® RNA II: nº de catálogo 740955.20 Macherey-Nagel. El rendimiento se determinó espectrofotométricamente.

Se aisló Poli(A) ARN a partir de ARN total con el kit NucleoTrap® mRNA: nº catálogo 740655 Macherey-Nagel.

El ARNm purificado fue eluido en H<sub>2</sub>O (libre de ARNasa) y se almacenó inmediatamente a -80°C.

##### Construcción de ADNc

- 40 **5'RACE**

La amplificación rápida de 5' de extremos de ADNc (RACE) fue llevada a cabo usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Se usó G<sub>RT</sub> para la transcripción inversa (RT), y la amplificación se llevó a cabo con G<sub>3</sub>.

Los cebadores específicos de gen usados en esta estrategia fueron:

Nombre de oligo	Secuencia de oligo
RACKFOR	CTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACGA (SEQ ID 12)
RACERAG1	AGGCTTGCAATCACCTCCACA (SEQ ID 13)

### Construcción de plásmido: clonación de fragmentos de PCR

Plásmido parental:

- 5 • pCR2.1-TOPO (kit de clonación TOPO TA de InVitrogen)

El fragmento de PCR purificado fue clonado en el vector usando la reacción Topo.

### Análisis de secuencia

10 El ADN procedente de la mini-preparación de plásmido de cuatro clones recombinantes de VL y la mini-preparación de plásmido de seis clones recombinantes de VH fue secuenciado del injerto en ambas direcciones usando los cebadores de secuenciación estándar M13F y M13R. Las dos secuencias respectivas de cada plásmido fueron ensambladas en una estructura contig usando VNTI contig expés. La parte fiable de las secuencias de consenso contig fue importada a los archivos de la base de datos de ADN NTI.

Las estructuras orf de IgG relevantes fueron identificadas y traducidas.

### Alineamiento de secuencia de búsqueda blast

#### 15 Análisis con ordenador

Análisis de secuencia: se llevó a cabo con VectorNTI de Informax Inc. usando el módulo Contig.

Búsquedas BLAST: fueron llevadas a cabo usando la [página web de NCBI \(http://www.ncbi.nlm.nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y del European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/homology.html>).

20 Alineamientos de proteína: todos los alineamientos fueron realizados con el paquete VectorNTI de Informax Inc usando el módulo ALIGN. Se realizaron alineamientos múltiples para las proteínas VL y VH de IgG y se editaron con CLUSTALW y GeneDoc.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

25 El anticuerpo NimoAb101 fue activado contra la subunidad CCP1-CCP2-SP de la MASP-2 humana. Nosotros amplificamos los genes del fragmento Fab mediante PCR de ARNm de hibridoma, usando cebadores que se hibridan en los dominios constantes C<sub>H</sub>1 y C<sub>L</sub> adaptados de bibliografía (1) y cebadores que se hibridan con un adaptador que se incorporó en el extremo 5' de los genes de ADNc. Los productos purificados de PCR de VL y VH fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO y secuenciados con los cebadores M13F y M13R. Todas las secuencias VH y todas las secuencias VL fueron idénticas. Las secuencias se muestran en las Figuras 8 a 10.

Definición de CRD Kabat

**Cadena ligera**  
 CDR1: residuos 24-34  
 CDR2: residuos 50-56  
 CDR3: residuos 89-97

**Cadena pesada**  
 CDR1: residuos 31-35  
 CDR2: residuos 50-65  
 CDR3: residuos 95-102

30

La comparación de las secuencias con datos publicados de región variable de anticuerpos indicó que el gen VL de NimoAb101 contenía una secuencia líder de 57 nucleótidos que codifican el péptido líder de 19 residuos de aminoácido, mientras que el gen VH de NimoAb101 presentó secuencias líder de 60 bases de longitud que codificaban un péptido líder de 20 residuos.



Mientras que la cadena ligera es un miembro típico del subgrupo de cadena kappa (rata-ratón-humano), la cadena pesada difiere de las cadenas pesadas de otras bases de datos. Tiene una inserción de 6 aminoácidos en el CDR H3 (después del residuo 100, numeración Kabat).

## REFERENCIAS

- 5 1) *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains*, publicado en Springer Verlag Laboratory Manual en *Antibody Engineering*, editado por Stefan Duebel y Roland Kontermann.

### Depósito biológico

Se ha depositado el siguiente material biológico en una institución depositaria reconocida siguiendo el Tratado de Budapest.

- 10 Una línea celular de hibridoma capaz de producir anticuerpos de MASP-2, capaz de inhibir la actividad de MASP-2, ha sido depositada con el número 03050904 en la EUROPEAN COLLECTION OF CELL CULTURES (ECACC), Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido. La línea celular es una línea celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de rata y células de mieloma de ratón. Dicha línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que se denomina en la presente memoria NimoAb101 ó NimoAb101 N128-71B. Las células se depositaron el 9 de mayo de 2003.

- 15 Una línea celular de hibridoma designada M0545YM035S2 (también denominada en la presente memoria M0545YM035) ha sido depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)", Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. La línea celular es una línea celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón. La referencia de identificación es N162-91A-01 a 12. Esta línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que en la presente memoria se denomina NimoAb104 ó "035" ó Ab035. Las células fueron depositadas el 6 de mayo de 2004.

- 20 Una línea celular de hibridoma designada M0545YM029S2 (también denominada en la presente memoria M0545YM029) ha sido depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)", Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. La línea celular es una línea celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón. La referencia de identificación es N162-90C-01 a 12. Esta línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que en la presente memoria se denomina NimoAb108 ó "029" ó Ab029. Las células fueron depositadas el 6 de mayo de 2004.

- 25 Una línea celular de hibridoma designada M0545YM046S2 (también denominada en la presente memoria M0545YM046) ha sido depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)", Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. La línea celular es una línea celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón. La referencia de identificación es N162-90D-01 a 12. Esta línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que en la presente memoria se denomina NimoAb109 ó "046" ó Ab046. Las células fueron depositadas el 6 de mayo de 2004.

- 30 Una línea celular de hibridoma designada M0545YM048S2 (también denominada en la presente memoria M0545YM048) ha sido depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)", Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania. La línea celular es una línea celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón. La referencia de identificación es N162-90E-01 a 12. Esta línea celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que en la presente memoria se denomina NimoAb110 ó "048" ó Ab048. Las células fueron depositadas el 6 de mayo de 2004.

### Referencias

- 35 Hemmila, I., Dakubu, S., Mukkala, V.M., Siitari, H. y Lovgren, T. (1984) Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal Biochem* 137, 335-43.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 522-525.
- 40 Liu, H., Jensen, L., Hansen, S., Petersen, S.V., Takahashi, K., Ezekowitz, A.B., Hansen, F.D., Jensenius, J.C. y Thiel, S. (2001) Characterization and quantification of mouse mannan-binding lectins (MBL-A and MBL-C) and study of acute phase responses. *Scand J Immunol* 53, 489-97.
- Nakajima, T. y Ballou, C.E. (1974) Characterization of the carbohydrate fragments obtained from *Saccharomyces cerevisiae* mannan by alkaline degradation. *J Biol Chem* 249, 7679-84.
- 45 Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N.M., Jensenius, J.C. and Arlaud, G.J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 276, 40880-7.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NatImmune A/S
- <120> Anticuerpos de MASP-2
- <130> P-772 PC00
- 5 <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 686
- <212> PRT
- 10 <213> Homo sapiens
- <400> SEQ ID 1

```

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1          5          10          15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20          25          30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35          40          45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50          55          60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65          70          75          80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85          90          95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100         105         110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115        120        125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130        135        140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145        150        155        160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn

```

	165		170		175										
Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	Arg
	180							185					190		
Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu
	195						200						205		
Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	Ile
	210					215					220				
Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Thr	Leu
225					230					235					240
Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	His	Gly
				245					250					255	
Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn
			260					265						270	
Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Thr	Gly
		275					280					285			
Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	His	Ala	Cys	Pro	Tyr	Pro	Met
	290					295					300				
Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Val	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu
305					310					315					320
Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	Gln
				325						330					335
Gly	His	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly
			340					345						350	
Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Ala	Cys	Ser	Ile	Val	Asp	Cys	Gly	Pro
		355					360						365		
Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Gly
	370					375						380			
Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe
385					390					395					400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly  
 405 410 415

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro  
 420 425 430

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly  
 435 440 445

Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly  
 450 455 460

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr  
 465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp  
 485 490 495

Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala  
 500 505 510

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly  
 515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile  
 530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser  
 545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr  
 565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile  
 580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro  
 595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly  
 610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
 625 630 635 640

ES 2 541 134 T3

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
 645 650 655

Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val  
 660 665 670

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe  
 675 680 685

- <210> 2
- <211> 142
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <400> SEQ ID 2

5

Met Ser Phe Ser Asn Thr Leu Val Phe Leu Leu Phe Leu Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Ile Leu Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Asn Phe Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Ile Tyr His Ala  
 65 70 75 80

Asp Thr Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr His Ser Arg Tyr Ile Pro Tyr Leu  
 115 120 125

Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

- <210> 3
- <211> 132
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <400> SEQ ID 3

10

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Thr  
 1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Cys  
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Ala Ser Asp Asp  
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ser Pro  
 50 55 60

Gln Leu Leu Ile Phe Asp Gly Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Met Lys  
 85 90 95

Ser Leu Gln Phe Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn  
 100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Ala Asp Ala Ala  
 130

- <210> 4
- <211> 156
- <212> PRT
- <213> Rattus norvegicus
- <400> SEQ ID 4

5

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

Cys Leu Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met Asn Trp Ile  
 20 25 30

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

Gly Gly Thr Tyr Ile Tyr His Ala Asp Thr Leu Lys Gly Arg Phe Thr  
 50 55 60

ES 2 541 134 T3

Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Thr Ser  
65 70 75 80

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr  
85 90 95

His Ser Arg Tyr Ile Pro Tyr Leu Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155

<210> 5  
<211> 159  
<212> PRT  
5 <213> Rattus norvegicus  
<400> SEQ ID 5

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Cys Ala Ser Leu Gly Glu  
1 5 10 15

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

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

Asp Gly Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Met Lys Ser Leu Gln Phe Glu  
65 70 75 80

Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Met Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly  
 115 120 125

Ala Thr Val Val Cys Phe Val Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Asp Ile Ser  
 130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Gln Arg Asp Gly Val Leu  
 145 150 155

5 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met  
 1 5

10 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 7

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Ile  
 1 5

15 <210> 8  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 8

Gly Pro Tyr His Ser Arg Tyr Ile Pro Tyr Leu Met Asp Ala  
 1 5 10

20 <210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 9

25 Arg Ala Ser Asp Asp Ile Tyr Ser Asn Leu Ala  
 1 5 10

30 <210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 10

Asp Gly Asn Arg Leu Ala Asp

1 5

35 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 11



Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 12

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220><221> característica\_miscelánea

<223 Cebador de PCR

<400> 12

ctcattcctg ttgaagctct tgacga

26

10 <210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220><221> característica\_miscelánea

15 <223 Cebador de PCR

<400> 13

aggcttgcaa tcacctccac a ..

21

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconocen específicamente y se unen a un fragmento de polipéptido de MASP-2 humana que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1), donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, son capaces de desplazar uno o más anticuerpos de referencia en un ensayo ELISA competitivo, donde el uno o más anticuerpos de referencia se seleccionan del grupo que consiste en:
- 10 i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
  - ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2657;
  - 15 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2660;
  - iv. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2658; y
  - v. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2659,
- donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, son capaces de inhibir la deposición de C4.
- 20 **2.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, son capaces de desplazar uno o más anticuerpos de referencia seleccionados del grupo que consiste en:
- 25 i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
  - ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2657; y
  - iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2660.
- 3.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- 30 i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
  - ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2657;
  - 35 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2660;
  - iv. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2658; y
  - v. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2659;
- o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.
- 40 **4.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv.
- 5.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
- 45 **6.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde el polipéptido fragmento de MASP-2 humana consta de los dominios de CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 363 a 686 de la SEQ ID 1).
- 7.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde el polipéptido fragmento de MASP-2 humana consta del dominio de serina proteasa (aminoácidos 445 a 686 de la SEQ ID 1).
- 50 **8.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, son capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
- 9.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en la SEQ ID 4.

10. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en la SEQ ID 5.
- 5 11. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en la SEQ ID 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en la SEQ ID 5.
- 10 12. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, comprende la CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID 8, donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, son capaces de inhibir la deposición de C4.
- 15 13. Un método para seleccionar un anticuerpo que reconozca específicamente y que se una a un fragmento de polipéptido de la MASP-2 humana que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1), donde dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4, comprendiendo dicho método las etapas de administrar a un mamífero un fragmento de polipéptido de MASP-2 humana que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1) o un homólogo funcional que sea idéntico en al menos un 98% a los aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1, evaluar si los anticuerpos son capaces de inhibir la deposición de C4 y seleccionar los anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4.
- 20 14. El método según la reivindicación 13, donde dicho fragmento de polipéptido de MASP-2 humana consiste en los dominios de CCP2 y serina proteasa.
- 25 15. El método según la reivindicación 13, donde dicho fragmento de polipéptido de MASP-2 humana consiste en el dominio de serina proteasa.
- 30 16. El método según la reivindicación 13, donde el método comprende además el aislamiento de células productoras del anticuerpo a partir de dicho mamífero, la preparación de células de hibridoma a partir de dichas células productoras de anticuerpo, el cultivo de dichos hibridomas y el aislamiento de los anticuerpos producidos por dichos hibridomas.
- 35 17. Un método para seleccionar un anticuerpo que reconozca específicamente y que se una a un fragmento de polipéptido de la MASP-2 humana que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1), comprendiendo dicho método las etapas de administrar a un mamífero un fragmento de polipéptido de MASP-2 que consiste en los dominios de CCP1, CCP2 y serina proteasa de MASP-2 (aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1) o un homólogo funcional del mismo que sea idéntico en al menos un 98% a los aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1, identificar y seleccionar los anticuerpos que reconozcan dicho polipéptido, y determinar si dichos anticuerpos son capaces de desplazar a uno o más anticuerpos de referencia en un ensayo ELISA competitivo, donde el anticuerpo de referencia se selecciona del grupo que consiste en:
- 40 i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
- 45 ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2657;
- iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2660;
- 40 iv. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2658; y
- v. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2659.
- 45 18. El método según la reivindicación 17, donde los anticuerpos de referencia se seleccionan del grupo que consiste en:
- i. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito 03050904;
- 50 ii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2657; y
- iii. el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de depósito DSM ACC2660.
19. El método según la reivindicación 17 ó 18, donde el método además comprende seleccionar anticuerpos capaces de desplazar al menos uno de dichos anticuerpos de referencia.
- 55 20. El método según la reivindicación 17 ó 18, donde la etapa de determinación de si dichos anticuerpos son capaces de desplazar uno o más anticuerpos de referencia en un ensayo ELISA competitivo comprende llevar a cabo las etapas de:

- 5
- i. Proporcionar MASP-2 o un fragmento de la misma que comprenda el epítipo reconocido por dicho anticuerpo de referencia; y
  - ii. Añadir un anticuerpo de ensayo y dicho anticuerpo de referencia a dicha MASP-2, donde el anticuerpo de ensayo o el anticuerpo de referencia están marcados con una etiqueta detectable, o ambos anticuerpos están marcados con diferentes etiquetas detectables; y
  - iii. Detectar la presencia de la etiqueta detectable en la MASP-2;
  - iv. Detectar de este modo si el anticuerpo de ensayo es capaz de desplazar al anticuerpo de referencia.
- 10
- 21.** El método según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, donde el método comprende además la evaluación de los anticuerpos para determinar si dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4, y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4.
- 22.** Un método para inhibir la deposición de C2 y/o C4 catalizada por MASP-2 que comprende las etapas de:
- i. Proporcionar una composición que comprenda MASP-2;
  - ii. Proporcionar un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15;
  - iii. Incubar dicha composición con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, inhibiendo de este modo la deposición de C2 y/o C4 catalizada por MASP-2,
- 15
- con la condición de que el método no lleve a cabo *in vivo*.
- 23.** El método según la reivindicación 22, donde la composición es suero.
- 24.** Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20
- 25.** Un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de una afección clínica en un individuo que lo necesite.
- 26.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 25, donde la afección clínica es isquemia/lesión por reperfusión.
- 25
- 27.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 26, donde la lesión es resultado de PTCA (angioplastia coronaria transluminal percutánea) o CABG (injerto de bypass de arteria coronaria).
- 28.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 26, donde dicha lesión es resultado de infarto agudo de miocardio o isquemia cerebral.
- 29.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 25, donde la afección clínica se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide y lupus sistémico eritematoso.
- 30
- 30.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 25, donde la afección clínica es una enfermedad inflamatoria crónica.
- 31.** El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 25, donde la afección clínica es una afección inflamatoria autoinmune.
- 35

Fig. 1

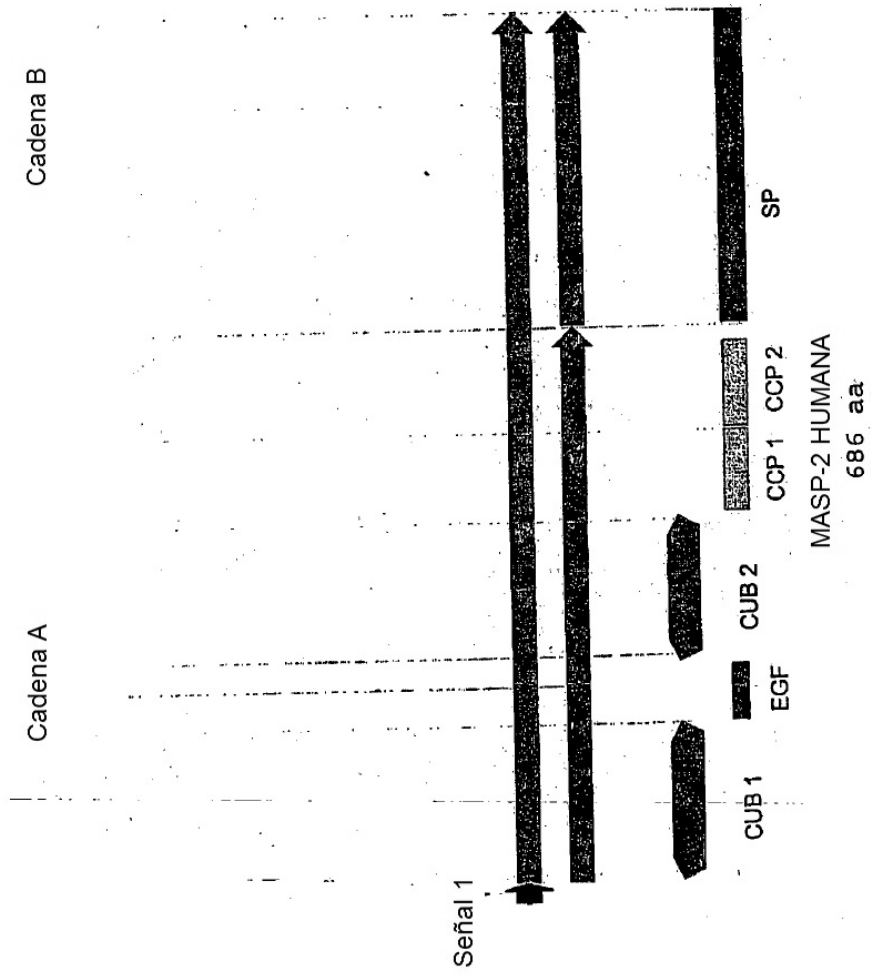


Fig. 2

		Clr/Clc →			
MASP-2	TPLGPKWPEPVFGRLASPGFEGEYANDQERRWLTAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLQYDFVKLSSGAVLWATLGGQESTDTERAPGKDT				90
MASP-1	HTVELNNMFQGIQSPGYSDSPDSSEVTWNIIVPDGPRIKLVFMHFNLESYLQYDYVKVETEDQVLATFGRETTDTEOTPGQEV				87
Clr	SIPIPQKLFGEVTSPLPQPKYPNNFETTITVITVPITGYRVLVQFQDLEPSDGEYDYVKISADKSKLGRFSGQLGSPLNPPGKKE				87
Clc	EPTMYGELSPNYPPQAYPSEVEKSWDIEVPEGYGIHLIYFTHLDIELSENQAYDSVQIISGDTEEGRLGGQRSSNNPHSPIVEE				83
		* * * * *			
		EGF →			
MASP-2	FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPTGFEAFYAEDIDEQQVAPGEA PTCDDHCGNHLGGFYSSCRAGYVLMHRNKRTCSALCS				170
MASP-1	VLSPGSFMSTFRSDFSNERRFTGFDARIYMAVDVDECK EREDEE LSCDHYGNYIGGYSSCRFGYILHTONRTGRVCS				167
Clr	FMSQGNKQLLTFHIDPSNEENGTFMYKGLAYQAVLDDEASRSKSGEEDPQQQHLQNYVGGYSSCRPGYELQEDRHSQAECS				177
Clc	FQVPYKQLQVIFKSDPSNEER FTGFAAYVATDINECT DFVD VPSNHFQANFISGGYSSCRPEYFLHDDMKKQGVNCS				161
		* * * * *			
		Clr/Clc →			
MASP-2	GQVFTQKRGELSSPEYPRPYPKLSSQYYSISLEEGFVILDFV ESFDVET HPETLQPYDFLKIQTDRREHGPFQKTLPHR IETKS				256
MASP-1	DNLFRTQRTGVITSPDPNPPYKSSSELYTTELEEGFMVWLOPE DIFDIED HPEVPPQPYDYIKIKVGPVLPFPGEKAPEP ISTQS				253
Clr	SELTYEASGYISSLEYPRSYPPDLRQNYISIRVERGLTLRLKFL EFDIDD HQQVHPPYDQLQIYANGNIGRFQKQRPDP LOTSS				263
Clc	GDVFTALIGEIASPNYPKYPENSRQCYQIRLEKGFQVVVTLRREDFDVEAADSAGNQLDSLVFVAGDRQFQPGYGGHFPGLMIETKS				250
		* * * * *			
		CCP-1 →			
MASP-2	NTVITITVTDSEGDHTGWIHYTSTAQPPYPMAPPN GHVSPVQAKVILKDSFISFETGYELLQGHLPKSFYAVQKDGSDWRMPA				345
MASP-1	HSVLILFHSNDNSGENRGMWLSYRAAGNEPELQPFVH GKIEPSQAKYFFKQVLSVSDTGYKVLKDNVEMDFQIEELKDGWNSKIPT				342
Clr	NAVLLFPDDESQDSRGMKLRATYTEIIRQPKTLDEFTIIQNLQPVQFRDYFIATKQGYQLIEGNOVLSFTAVQDDGTWHRAMPR				353
Clc	NALDIIFQDLDLTKKQKGLRYHGDPMPQPKEDTIN SVWEPKAKYVFRDVVQITLQDGFVVEGRVATSFYSTQSNQKWSNSKIK				338
		* * * * *			
		CCP-2 →			
MASP-2	ESIVDEGPPDDLPSGRVEYITGPGVITYKAVIQVSSSETPYTM KVNQDKYVCEADGFWTSSKGEKLEVPQFVGLS ARTT				426
MASP-1	QKIVDQKAPGELEHGLITFSTRNNLITYKSEIKYSQEPFYTKL NNNTGIYTSQAQGVWAKVLRSLPTLPLVGLPKFGRKL				426
Clr	QKIKDQKQPNLQNGDFRYTTMGVNTYKARIQYVHEFYTKMQRAGSRESEGGVYTTAQGIWKNEQKQEKIPLKLPVGGKPVNVEQ				443
Clc	QPVVDEGIPESIENGKVE DPESTLFGSVIRYTSSEPPYYME NGGGGEYHAGHGSWVNEVLGPELQKVPVQVGPREFEE				419
		* * * * *			
		serine protease →			
MASP-2	GGRIYGGQKAKPQDFPWQVLLGGTTA AGALLYDNWVLTAAH AVVEQKHDSALDIRMGLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEG				507
MASP-1	MARIENGRPAQKGTTPWIAMLSHLNGQPFQGGSLGSSWIVTAAHCLHQSLDKPDLRSDLLSPSD PKIILGKQWLRSDENEQHLG				515
Clr	RQRIIGGQKAKMGNFPWQVFNHGRG GGALLGDRWILTAAH TLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMGLGNHP IRRV				523
Clc	KORIIGGSDADIKHFPWQVFDNFWA GGALINEYWVLTAAH VVEGNREPTMYVGSTVQTSRLAKSKMLT PEHVFIHFG				498
		* * * * *			
		Linker →			
MASP-2	YTHDAG FDNIALIKLNKVVINSNITPIQLPRKEAESFMRTDDIGTAGHGLTQRGFLARNLMYVDPIVDHOKCIAAYEK				589
MASP-1	VKHTTLRPKVDPTNFENDVALVELLESPLVNAFVMPICLP EGPQQEGAMVIVSGWQFLQRFPELMEIEIPIVDHSTQKAY				599
Clr	SVHPDYRQDESYN FEGDIALLELENSVTLGNLPLICLP DNDTFYDLGLMGVYSGFGVMEEK IAHDLRFVRLPVANPQAEEN WLR				608
Clc	WKLELV PEGRTN FDNQIALVRLKDPVIMGPTVSPICLPQGTSSDYNLMDGDLGLISGWRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLAKKQEVKVE				586
		* * * * *			
		serine protease →			
MASP-2	PPYPRG SVTANMLQAGLESQKDSQKQDSSGGALVFLDS ETERWFGGIVSWGSMNTEGAGQYGVYTKVINIYPIWNIISDF				671
MASP-1	APLKK KVTQDMIQAGEKGGKDAQSGDSSGGMVTLNR ERGQWLVGTVSWGD DEGKQDRYGVYSYIHNKNDWIQRTVGVNR				680
Clr	GKQKMD VFSQNMFGAGHPSLKQDAQKQDSSGGVFAVRDP NDRWVATGIVSWGI GQSRG YGFYTKVNLVYVDWIKKEMEBED				688
Clc	KPTADAEAYVTPNMIQAGGK GMSQKQDSSGGAFVQDFNDRTKPYAAGLVSNQP QGT YGLYTRVKNVYVDWIKTMQENSTPRED				673
		* * * * *			

Fig. 3

Inhibición de la deposición de C4 en suero humano completo  
 procedente de 13 individuos diferentes

(N108-74A+77A+82A)

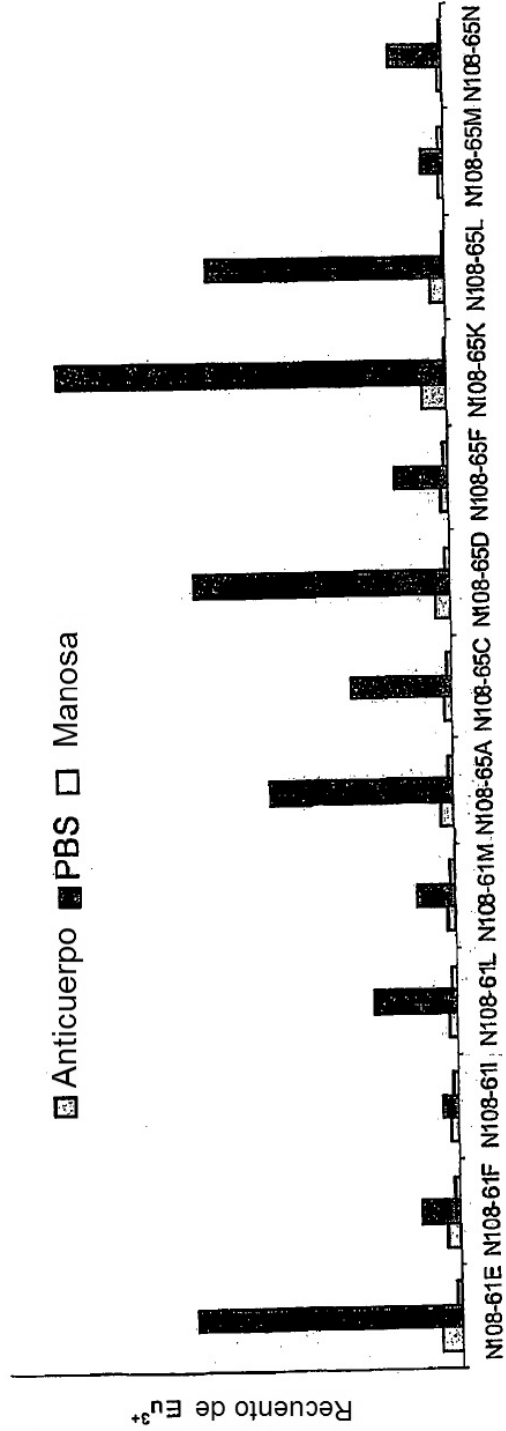


Figura 4

Inhibición de la deposición de C4 en suero completo por Ab de MASP-2.  
Tiempo de preincubación desde 5 min a 2h. C4 añadido.  
N108-38A

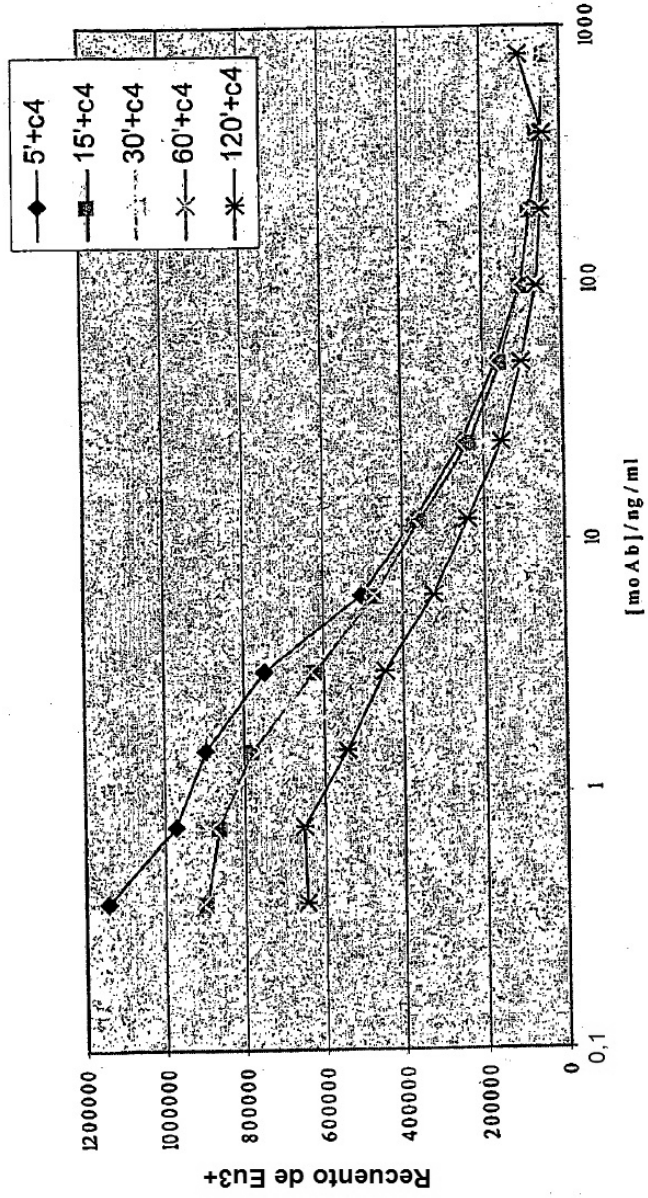
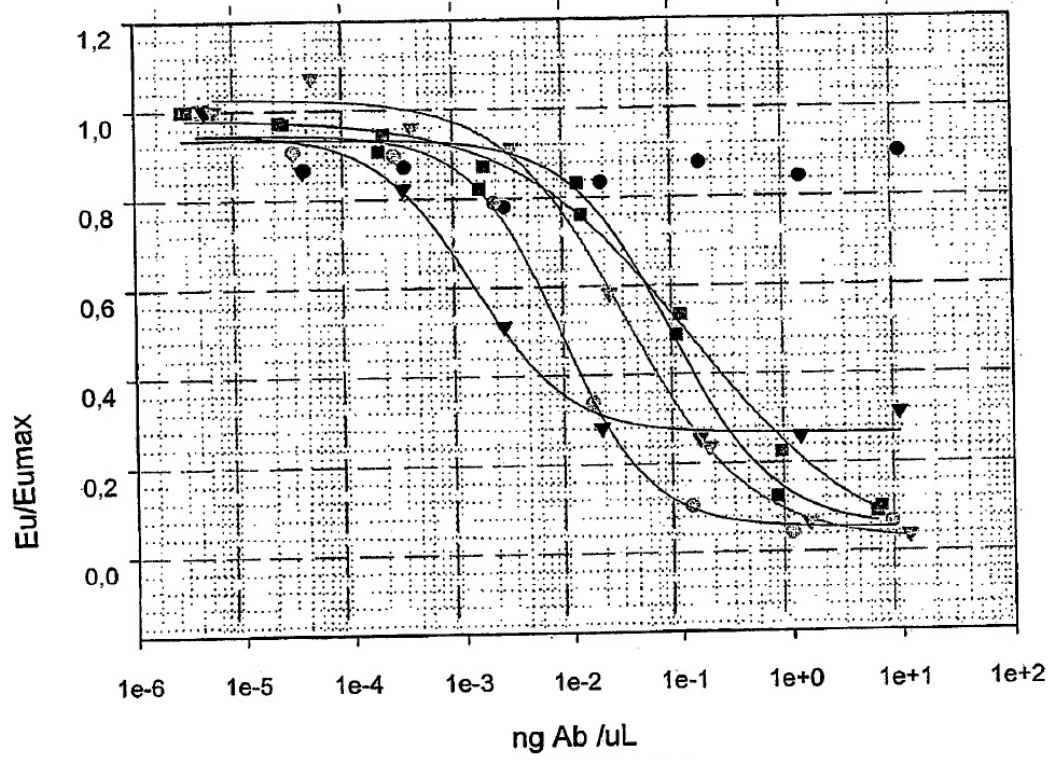




Fig. 5



- 002ng/ul vs Eu/Eumax  
IC50 =
- ⊙ 035 ng/ul vs Eu/Eumax  
IC50=0,008
- ▼ 029 ng/ul vs Eu/Eumax  
IC50 = 0,001
- ▽ Nimoab101 ng/ul vs Eu/Eumax  
IC50 = 0,0318
- 046 ng/uL vs Eu/Eumax  
IC50 = 0,0833
- ▣ 048 ng/uL vs Eu/Eumax  
IC50 = 0,1288

Fig. 6

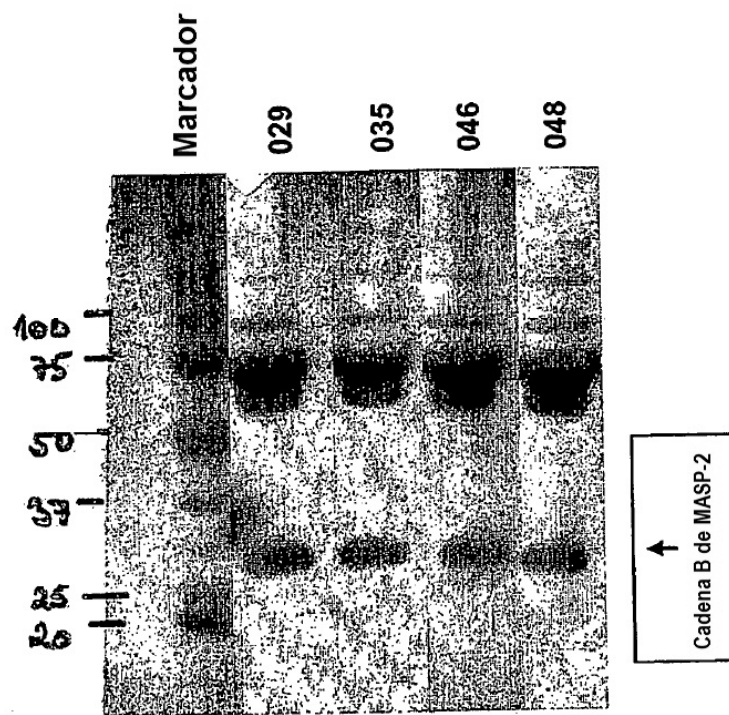


Fig. 7

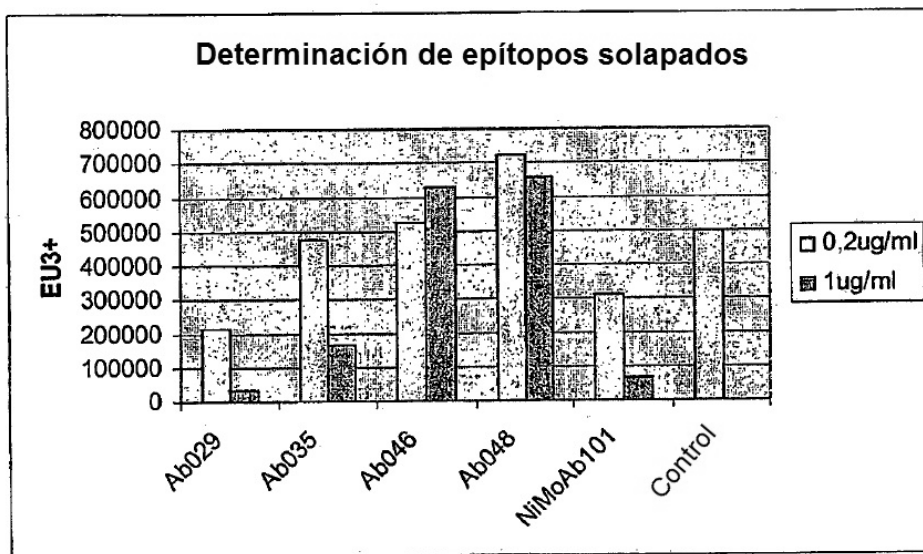
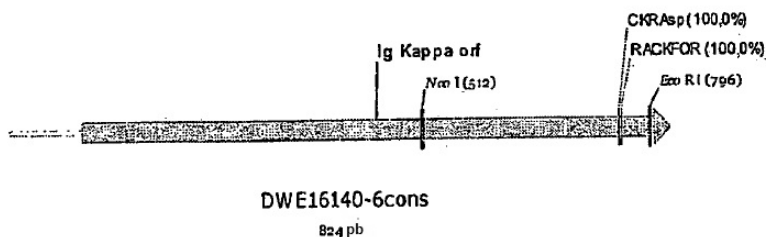


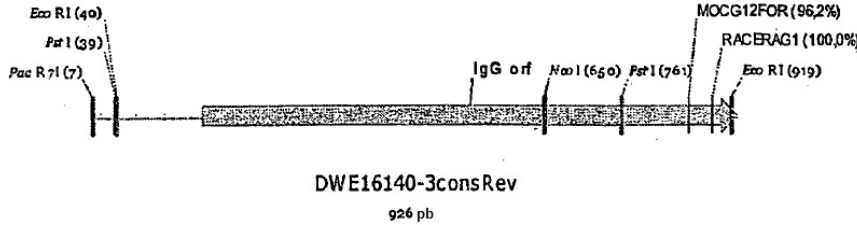
Fig. 8



```

1 AATTCGCCCT TCTAATACGA CTCACTATAG GGCAAGCAGT GGTATCAACG CAGAGTACGC
      Met GlyValPro ThrGlnLeu LeuGlyLeuLeu.
61 GGGGAGTCTC ACAGAGGTCA CACACAGACA TGGGTGTCCC CACTCAGCTC CTGGGGTTGT
  .LLeuLeuTrp IleThrAsp AlaIleCysAsp IleGlnMet ThrGlnSer ProGlySerLeu.
121 TGCTACTGTG GATAACAGAT GCCATATGTG ACATCCAGAT GACACAGTCT CCAGGTTCCC
  .LCysAlaSer LeuGlyGlu ThrValThrIle GluCysArg AlaSerAsp AspIleTyrSer.
181 TGTGTGCATC TCTGGGAGAA ACTGTCACCA TCGAATGTCG AGCAAGTGAC GACATTTACA
  .SAsnLeuAla TrpTyrGln GlnLysProGly AsnSerPro GlnLeuLeu IlePheAspGly.
241 GTAATTTAGC GTGGTATCAG CAAAACCAG GGAAGTCTCC TCAGTCTCTG ATCTTTGATG
  .CAsnArgLeu AlaAspGly ValProSerArg PheSerGly SerGlySer GlyThrGlnTyr.
301 GAAATCGGTT GGCAGATGGG GTCCCATCAC GATTCACTGG CAGTGGATCT GGCACACAGT
  .TSerLeuLys MetLysSer LeuGlnPheGlu AspValAla SerTyrPhe CysGlnGlnTyr.
361 ATTCTCTAAA GATGAAGAGC CTCGAATTTG AAGATGTCGC AAGTTATTTT TGTCACACAGT
  .TAsnAsnTyr ProLeuThr PheGlySerGly ThrLysLeu GluIleLys ArgAlaAspAla.
421 ATAATAATTA TCCGCTCAGC TTCGGTCTCG GGACCAAGCT GGAGATCAA CGGGCTGATG
      NcoI
      -----
  .AAlaProThr ValSerIle PheProProSer MetGluGln LeuThrSer GlyGlyAlaThr.
481 CTGCACCAAC TGATCCATC TTCCACCAT CCATGGAACA GTTAACATCT GGAGGTGCCA
  .TValValCys PheValAsn AsnPheTyrPro ArgAspIle SerValLys TrpLysIleAsp.
541 CAGTCGTGTG CTCGTGAAC AACTTCTATC CCAGAGACAT CAGTGTCAAG TGAAGATTG
  .AGlySerGlu GlnArgAsp GlyValLeuAsp SerValThr AspGlnAsp SerLysAspSer.
601 ATGGCAGTGA ACAACGAGAT GGTGTCCTGG ACAGTGTAC TGATCAGGAC AGCAAAGACA
  .SThrTyrSer MetSerSer ThrLeuSerLeu ThrLysVal GluTyrGlu ArgHisAsnLeu.
661 GCACGTACAG CATGAGCAGC ACCCTCTCGT TGACCAAGGT TGAATATGAA AGGCATAACC
  .LTyrThrCys GluValVal HisLysThrSer SerSerPro ValValLys SerPheAsnArg.
721 TCTATACCTG TGAGGTTGTT CATAAGACAT CATCCTCACC CGTCGTCAAG AGCTTCAACA
      -----
      RACKFOR 100,0%
      -----
      CKRAsp 100,0%
      -----
      EcoRI
      -----
  .AAsnGluLys GlyGluPhe GlnHisThrGly GlyArgTyr
781 GGAATGAGAA GGGCGAATTC CAGCACACTG GCGGCCGTTA CTAG
      -----
      .....
      -----
      .....
  
```

Fig. 9



	PaeR7I		PstI		EcoRI	
1	GCATGCTCGA	GCGGCCGCCA	GTGTGATGGA	TATCTGCAGA	ATTCGCCCTT	CTAATACGAC
61	TCACATATAGG	GCAAGCAGTG	GTATCAACGC	AGAGTCCGCG	GGGGACCCCT	GGTTTTCAG
					MetSerPhe	SerAsnThrLeu
121	GTCCTCACAT	TCAGTGATCT	GCACTGCACA	GACCATCCAC	CATGAGTTTC	AGCAACACCT
	·LValPheLeu	LeuPheLeu	LeuLysGlyIle	LeuCysGlu	ValGlnLeu	ValGluProGly
181	TGGTTTTCCT	TTTGTTCCTT	TTAAAAGGTA	TCCGTGTGTA	GGTGCAGCTG	GTGGAGCCTG
	·GGlyGlyLeu	ValGlnPro	GlyArgSerLeu	LysLeuSer	CysLeuVal	SerGlyPheThr
241	GAGGAGGCTT	AGTGCAGCCT	GGAAGGTCCC	TGAAACTCTC	CTGTTTAGTC	TCTGGATTCA
	·TPheSerAsn	PheGlyMet	AsnTrpIleArg	GlnAlaPro	GlyLysGly	LeuGluTrpVal
301	CTTTCAGTAA	CTTTGGAATG	AACTGGATTG	GCCAGGCTCC	AGGGAAGGGA	CTGGAGTGGG
	·ValaSerIle	SerSerGly	GlyThrTyrIle	TyrHisAla	AspThrLeu	LysGlyArgPhe
361	TTGCATCTAT	CAGTAGTGGT	GGTACTTATA	TCTACCATGC	AGACACATFG	AAGGGCCGAT
	·PThrIleSer	ArgGluAsn	AlaLysAsnThr	LeuTyrLeu	GlnMetThr	SerLeuArgSer
421	TCACCATCTC	CAGAGAAAAT	GCCAAGAACA	CCCTGTACCT	GCAAATGACC	AGTCTGAGGT
	·SGLuAspThr	AlaLeuTyr	TyrCysAlaArg	GlyProTyr	HisSerArg	TyrIleProTyr
481	CTGAAGACAC	TGCCTTGTAT	TACTGTGCAA	GAGGGCCTTA	CCATAGCAGG	TATATCCCCT
	·TLeuMetAsp	AlaTrpGly	GlnGlyAlaSer	ValThrVal	SerSerAla	GluThrThrAla
541	ATCTTATGGA	TGCCTGGGGT	CAAGGAGCTT	CAGTCACTGT	CTCCTCAGCT	GAAACAACAG
					NcoI	
601	CCCCATCTGT	CTATCCACTG	GCTCCTGGAA	CTGCTCTCAA	AAGTAGCTCC	ATGGTGACCC
	·LGlyCysLeu	ValLysGly	TyrPheProGlu	ProValThr	ValThrTrp	AsnSerGlyAla
661	TGGATGCCT	GGTCAAGGGC	TATTTCCCTG	AGCCAGTCAC	CGTGACCCTG	AACTCTGGAG
					PstI	
721	CCCTGTCCAG	CGGTGTGCAC	ACCTTCCCAG	CTGTCCCTGCA	GTCTGGGCTC	TACACTCTCA
	·TSerSerVal	ThrValPro	SerSerThrTrp	ProSerGln	ThrValThr	CysAsnValAla
781	CCAGCTCAGT	GACTGTACCC	TCCAGCACCT	GCCCCAGCCA	GACCGTCACC	TGCAACGTAG
	·AHisProAla	SerSerThr	LysValAspLys	LysIleVal	ProArgAsn	CysGlyGlyAsp
841	CCCACCCGGC	CAGCAGCACC	AAGGTGGACA	AGAAAATTGT	GCCCAGA AAC	TGTGGAGGTG
901	ATTGCAAGCC	TAAGGGCGAA	TTCCAG			

MCG12FOR 96,2% RACERAG1 100,0%

-----  
EcoRI  
-----  
-----  
-----

·AcysLysPro LysGlyGlu PheGln  
ATTGCAAGCC TAAGGGCGAA TTCCAG

Fig. 10

```

Estructura      --- señal -----]-----[---H1---]-----
P18525          MNFGLSLIFLVLVLKGVLCVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMWVVRQTP
P18526          MNFGLRLIFLVLTLKGVKCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFAPSSYDMSWVRQTP
P18529          MNFVLSLIFLALILKGVQCEVHLVESGGGLVQPGGSLKLSVSVSGFTFNKYAMSWVRQTP
P01764          MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
P01783          ---RLNLVFLVLILKGVQCDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAP
DWE16140-4con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
DWE16140-5con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
DWE16140-1con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
DWE16140-2con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
DWE16140-3con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
DWE16140-8con  MSFSNTLVFLFLFKGILCEVQLVESGGGLVQPGRSKLSCLVSGFTFSSNFGMNWIRQAP
P01868          -----
P01869          -----
P20759          -----
P20760          -----

Estructura      -----[---H2---]-----[---
P18525          EKRLWVAYISNGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNKNNLYLQMSLKSSEDAMYYCAR---
P18526          EKRLWVAYISSGGSTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYCAR---
P18529          EKRLWVATISSGGLYTYYPDSVKGRFTISRDNAGNTLYLQMSLRSSEDAMYYCAR---
P01764          GKGLEWVASISSGGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAK---
P01783          EKGLEWVAYISSGSSTLHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARWGN
DWE16140-4con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
DWE16140-5con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
DWE16140-1con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
DWE16140-2con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
DWE16140-3con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
DWE16140-8con  GKGLEWVASISSGGTYIYHADTLKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRSEDALYYCARGPY
P01868          -----
P01869          -----
P20759          -----
P20760          -----

Estructura      -H3-----]-----[-----CH1-----
P18525          -----
P18526          -----
P18529          -----
P01764          -----
P01783          ---YPPYAMDYWGQGSVTVSS-----
DWE16140-4con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
DWE16140-5con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
DWE16140-1con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
DWE16140-2con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
DWE16140-3con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
DWE16140-8con  HSRYPYLMDAWGQGASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
P01868          -----AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVT
P01869          -----AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVT
P20759          -----AETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT
P20760          -----AETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVT

P18525          -----
P18526          -----
P18529          -----
P01764          -----
P01783          -----
DWE16140-4con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
DWE16140-5con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
DWE16140-1con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
DWE16140-2con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
DWE16140-3con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
DWE16140-8con  VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
P01868          -----
P01869          -----
P20759          -----
P20760          -----VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVVAPASSTKVDKIV
    
```

Fig. 11

```

Estructura          --- Señal --- [---L1---]-----
DWE16140-6con      MGVPTQLLGLLLWITDAICDIQMTQSPGSLCASLGETVTIECRASDDIYSNLAWYQQKP
DWE16140-7con      MGVPTQLLGLLLWITDAICDIQMTQSPGSLCASLGETVTIECRASDDIYSNLAWYQQKP
DWE16140-10con     MGVPTQLLGLLLWITDAICDIQMTQSPGSLCASLGETVTIECRASDDIYSNLAWYQQKP
DWE16140-9         MGVPTQLLGLLLWITDAICDIQMTQSPGSLCASLGETVTIECRASDDIYSNLAWYQQKP
P01594             -----DIQMTQSPSSLSASVGDVVTITCQASQDISDYLNWYQQKP
P01595             -----DIQMTQSPSPLSASVGDVVTITCQASQDIRNSLIWYQQKP
P01635             MSVLTQVLALLLWLTGARCIDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQ
P01636             -----DIQMTQSPDYLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQ
P01637             MRTPAQFLGILLWFPFGIKCDIKMTQSPSSMYASLGERVTISCKASQDINSYLTWFOQKP
P01835             -----
P01836             -----
P01837             -----

Estructura          ----- [-L2-] ----- [---L3---]---
DWE16140-6con      GNSPQLLIFDGNRLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKMKSLQFEDVASYFCQQYNNYPLTFGS
DWE16140-7con      GNSPQLLIFDGNRLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKMKSLQFEDVASYFCQQYNNYPLTFGS
DWE16140-10con     GNSPQLLIFDGNRLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKMKSLQFEDVASYFCQQYNNYPLTFGS
DWE16140-9         GNSPQLLIFDGNRLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKMKSLQFEDVASYFCQQYNNYPLTFGS
P01594             GKAPKLLIYDASNLESGVPSRFRSGSGSGAHFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDYLPTWTFGQ
P01595             GKAPKFLIYDAENLEIGVPSRFRSGSGSGTDFAISSLQPEDFATYYCQQYNNLPYTFGQ
P01635             GKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKINSLOPEDFGSYCQHYGIPPTFGS
P01636             GKSPQLLVYDAKTLVEGVPSRFRSGSGSGTQYSLKINSLOPEDFGSYCQHYGIPPTFGS
P01637             GKSPKTLLYRANRLVDGVPSRFRSGSGSGQDFSLTISSEYEDMGIYYCLQYDFEPLTFGA
P01835             -----
P01836             -----
P01837             -----

Estructura          ----- [-CL-] -----
DWE16140-6con      GTKLEIKRADAAPTYSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL
DWE16140-7con      GTKLEIKRADAAPTYSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL
DWE16140-10con     GTKLEIKRADAAPTYSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL
DWE16140-9         GTKLEIKRADAAPTYSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL
P01594             GTKVEIKR-----
P01595             GTKLEIKR-----
P01635             -----
P01636             GTKLEIKR-----
P01637             GTKLEIKR-----
P01835             -----ADAAPTYSIFPPSTEQLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVL
P01836             -----ADAAPTYSIFPPSMEQLTSGGATVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL
P01837             -----ADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFVNNFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVL

Estructura          -----
DWE16140-6con      DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEKGEFQHT
DWE16140-7con      DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEKGEFQHT
DWE16140-10con     DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEKGEFQHT
DWE16140-9         DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEKGEFQHT
P01594             -----
P01595             -----
P01635             -----
P01636             -----
P01637             -----
P01835             DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC-----
P01836             DSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTKVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC-----
P01837             NSWTDQDSKSDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKTSSTPIVKSFNRNEC-----
    
```

Secuencia de la cadena pesada (DWE16140-1, 2, 3, 4, 5, 8) y secuencia de la cadena ligera (DWE16140-6, 7, 10, 9) del anticuerpo Nimoab101 alineado con las secuencias homólogas identificadas mediante búsquedas Blast.