

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 352**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2010 PCT/EP2010/007197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO2011063980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2010 E 10782561 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2504362**

54 Título: **Unidades estructurales de unión anti-C5a con actividad bloqueadora alta**

30 Prioridad:

26.11.2009 EP 09014745

26.11.2009 US 264696 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

INFLARX GMBH (100.0%)

Winzerlaer Strasse 2

07745 Jena, DE

72 Inventor/es:

GUO, RENFENG;

RIEDEMANN, NIELS, CHRISTOPH;

LI, YAN y

SHEN, BEIFEN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 613 352 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

Unidades estructurales de unión anti-C5a con actividad bloqueadora alta

La presente invención se refiere a unidades estructurales de unión que se unen específicamente a un epítipo conformacional de C5a, en particular C5a humano. Las unidades estructurales de unión preferidas son anticuerpos anti-C5a que se unen a este epítipo conformacional. Las unidades estructurales de unión descritas en la presente memoria son útiles como agentes activos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades agudas y crónicas, en particular enfermedades inflamatorias agudas, tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y diferentes grados de sepsis incluyendo sepsis, sepsis severa y choque séptico.

Antecedentes de la invención

C5a se escinde de C5 tras la activación del complemento. Entre los productos de activación del complemento, C5a es uno de los péptidos inflamatorios más potentes, con un amplio espectro de funciones (Guo y Ward, 2005). C5a es una glicoproteína presente en la sangre de seres humanos sanos con un peso molecular de 11,2 kDa. La porción polipeptídica de C5a contiene 74 aminoácidos, lo que representa un peso molecular de 8,2 kDa mientras que la parte del carbohidrato representa aproximadamente 3 kDa. C5a ejerce sus efectos a través de los receptores C5a de alta afinidad (C5aR y C5L2) (Ward 2009). C5aR pertenece a la familia del tipo de la rodopsina de receptores acoplados a proteína G con siete segmentos transmembrana; C5L2 es similar pero no está acoplado a proteína G. Actualmente se cree que C5a ejerce sus funciones biológicas principalmente a través de la interacción C5a-C5aR, ya que se han encontrado pocas respuestas biológicas para la interacción C5a-C5L2. C5aR se expresa ampliamente en células mieloides incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, y células no mieloides en muchos órganos, especialmente en el pulmón y el hígado, lo que indica la importancia de la señalización de C5a/C5aR. C5a tiene una variedad de funciones biológicas (Guo y Ward 2005). C5a es un quimioatrayente fuerte para neutrófilos y también tiene actividad quimiotáctica para monocitos y macrófagos. C5a provoca una explosión oxidativa (consumo de O₂) en neutrófilos y mejora la fagocitosis y la liberación de enzimas granulares. También se ha encontrado que C5a es un vasodilatador. Se ha demostrado que C5a está implicada en la modulación de la expresión de citoquinas de diversos tipos de células, para reforzar la expresión de moléculas de adhesión sobre los neutrófilos. Se ha encontrado que C5a se convierte en altamente perjudicial cuando se produce excesivamente en la configuración de la enfermedad, ya que es un fuerte inductor y reforzador de las respuestas inflamatorias que actúan en dirección opuesta a la cadena de reacción inflamatoria. Altas dosis de C5a pueden conducir a "desensibilización" quimiotáctica no específica para los neutrófilos, causando así disfunción generalizada (Huber-Lang y colaboradores, 2001a).

Se ha reportado que C5a ejerce numerosas respuestas proinflamatorias, y se ha reportado que es perjudicial durante la sepsis. Se ha demostrado que la inhibición de C5a o del receptor de C5a (C5aR) por anticuerpos mejora dramáticamente la supervivencia en diversos modelos de sepsis en ratones y ratas (Czermak y colaboradores, 1999, Huber-Lang y colaboradores, 2001b; Riedemann y colaboradores, 2002a). Además, varios reportes han demostrado los efectos nocivos de C5a para las funciones innatas intactas inmunes y de órganos durante la sepsis experimental (Guo y colaboradores, 2000, Huber-Lang y colaboradores, 2002, Huber-Lang y colaboradores, 2002, Laudes y colaboradores, 2002, Riedemann y colaboradores, 2003, Riedemann y colaboradores, 2004a, Riedemann y colaboradores, 2004b). C5a actúa como una anafilatoxina y se ha reportado que ejerce numerosos efectos proinflamatorios. En humanos, se ha reportado que altos niveles de sepsis de C5a se asocian con resultados significativamente desmejorados en diversos estudios (Bengtson y Heideman 1988, Nakae y colaboradores, 1996).

En el establecimiento experimental de la sepsis, la exposición de los neutrófilos a C5a puede conducir a la disfunción de los neutrófilos y parálisis de las vías de señalización, lo que conduce a una configuración defectuosa de la NADPH oxidasa, parálisis de las cascadas de señalización MAPK, a una ráfaga oxidativa, fagocitosis y quimiotaxis muy deprimidas. Guo y colaboradores, 2006a, Huber-Lang y colaboradores, 2002). La apoptosis de timocitos y la apoptosis retardada de los neutrófilos son dos eventos patógenos importantes para el desarrollo de la sepsis, que dependen de la presencia de C5a (Guo y colaboradores, 2000, Guo y colaboradores, 2006b). Durante la sepsis experimental, C5a sobrerregula la expresión de la integrina $\beta 2$ en los neutrófilos para promover la migración celular hacia los órganos (Guo y colaboradores, 2002), una de las principales causas de insuficiencia multiorgánica (MOF). También se encuentra que C5a es atribuible a la activación de la ruta de coagulación que se produce en la sepsis experimental (Laudes y colaboradores, 2002). C5a estimula la síntesis y liberación de leucocitos humanos de las citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Hopken y colaboradores, 1996; Riedemann y colaboradores, 2004a; Strieter y colaboradores, 1992). C5a produce un fuerte efecto sinérgico con LPS en la producción de TNF- α , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2, quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquina (CINC)-1 e IL-1 β en células epiteliales alveolares (Riedemann y colaboradores, 2002b; Rittirsch y colaboradores, 2008). Dado que la activación del complemento es un evento que ocurre durante el inicio de la sepsis, C5a puede entrar en juego antes de la aparición de la "tormenta de citoquinas inflamatorias". Parece que C5a desempeña un papel clave en la orquestación del desempeño de la red de citoquinas y la formación de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). El bloqueo de C5a en el marco de la sepsis experimental atenúa dramáticamente MOF y SIRS. La sobrerregulación extendida de la expresión de C5aR se produce durante el inicio de la sepsis y el bloqueo de la interacción C5a/C5aR por anticuerpos anti-C5a o anti-C5aR o los antagonistas de C5aR

producen efectos altamente protectores en modelos de roedores de sepsis (Czermak y colaboradores, 1999; Huber-Lang y colaboradores, 2001b; Riedemann y colaboradores, 2002a).

Además de la indicación de sepsis, también se ha demostrado que el bloqueo de C5a es protector en muchos otros modelos de inflamación tales como lesión por isquemia/reperfusión, enfermedad renal, rechazo de injerto, malaria, artritis reumatoide, enfermedad intestinal infecciosa, enfermedad de pulmón inflamatorio (Klos y colaboradores, 2009) y Allegretti M. y colaboradores. (Allegretti y colaboradores, 2005). Además, se ha descubierto recientemente que el bloqueo de C5a ha mostrado un fuerte beneficio terapéutico en un modelo de tumor en ratones (Markiewski y colaboradores, 2008).

Problemas técnicos subyacentes de la presente invención

Los anticuerpos que se unen específicamente a la parte C5a pero no a la parte C5b de C5 son conocidos a partir de la técnica anterior (Klos y colaboradores (1998) J. Immunol Meth. 111: 241-252; WO 01/15731; WO 03/015819).

Sin embargo, los anticuerpos anti-C5a generados previamente exhibían solamente actividades de bloqueo moderadas sobre los efectos biológicos inducidos por C5a. En consecuencia, los anticuerpos anti-C5a de la técnica anterior no eran capaces de lograr un bloqueo completo de los efectos biológicos inducidos por C5a o tenían que usarse en cantidades superestequiométricas para alcanzar un bloqueo razonablemente alto de la actividad de C5a.

Por lo tanto, especialmente teniendo en cuenta un posible uso clínico en pacientes, seguía existiendo en la técnica anterior la necesidad de anticuerpos anti-C5a u otras unidades estructurales de unión que mostraran una actividad de bloqueo más fuerte para efectos biológicos inducidos por C5a mientras que se unen específicamente a C5a con alta afinidad. Además, preferiblemente dichos anticuerpos no deben unirse a C5b y, en consecuencia, no deben afectar las actividades biológicas de C5b.

Muy sorprendentemente, los inventores de la presente invención fueron capaces de identificar un nuevo epítipo de unión conformacional con anticuerpos de unión correspondientes que cumplen los requisitos avanzados antes mencionados y otros. En experimentos tediosos subyacentes a la presente invención, podrían generarse dos anticuerpos anti-C5a de los más de 2000 que exhiben una actividad de bloqueo sin precedentes frente a los efectos biológicos inducidos por C5a cuando se emplean en cantidades estequiométricas, es decir, 0,5 moles de un anticuerpo bivalente por mol de C5a.

La visión de conjunto anterior no describe necesariamente todos los problemas resueltos por la presente invención.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una unidad estructural de unión que se une a un epítipo conformacional formado por las secuencias de aminoácidos NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) y SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) de C5a, en donde la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3; en donde dicha unidad estructural de unión tiene una constante de unión de C5a con un valor de K_d de 10 nM o menos y exhibe al menos 80% de actividad de bloqueo para un efecto biológico inducido por C5a; y en donde dicha unidad estructural de unión se selecciona del grupo que consiste en: (a) anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos; y (b) proteínas similares a anticuerpo, en donde dichas proteínas similares a anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste en aficuerpos, anticalinas, y proteínas diseñadas de repeticiones de anquirina.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la unidad estructural de unión de acuerdo con el primer aspecto y que comprende además uno o más portadores, diluyentes, excipientes, rellenos, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegrantes, adsorbentes, y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una unidad estructural de unión de acuerdo con el primer aspecto para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades que implican inflamación aguda tal como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión tales como cardiopatía isquémica, lesión pulmonar aguda, neumonía, rechazo agudo y crónico de injerto en pacientes trasplantados, reacciones de injerto contra huésped, pero también enfermedades que implican un tipo crónico de inflamación tales como enfermedades glomerulares renales tales como glomerulonefritis y otras entidades de insuficiencia renal, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes similares tales como enfermedad de Bechterew, enfermedades del tipo lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, crecimiento tumoral o cáncer de órganos sólidos.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de describir la presente invención en forma detallada más adelante, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene como propósito describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica.

Preferiblemente, los términos usados en la presente memoria se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (Recomendaciones de la IUPAC)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprendiendo" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Tal como se usa en la presente memoria, "C5a humana" se refiere al siguiente péptido de 74 aminoácidos:

TLQKKIEEIA AKYKHSVVKK CCYDGACVNN DETCEQRAAR ISLGPRCIKA
FTECCVVASQ LRANISHKDM QLGR (SEQ ID NO: 1).

El término "unidad estructural de unión", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que se puede unir específicamente a una molécula objetivo o epítipo objetivo. Las unidades estructurales de unión preferidas en el contexto de la presente solicitud son (a) anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión al antígeno; o (b) proteínas similares a anticuerpos. Las "unidades estructurales de unión" que pueden usarse para practicar la presente invención son capaces de unirse a un epítipo conformacional de C5a de mamífero que está formado por las dos secuencias de aminoácidos NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) y SHKDMQL (SEQ ID NO: 3).

Como se usa en la presente memoria, se considera que un primer compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) se "une" a un segundo compuesto (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína objetivo), si tiene una constante de disociación K_d para dicho segundo compuesto de 1 mM o menos, preferiblemente 100 μ M o menos, preferiblemente 50 μ M o menos, preferiblemente 30 μ M o menos, preferiblemente 20 μ M o menos, preferiblemente 10 μ M o menos, preferiblemente 5 μ M o menos, más preferiblemente 1 μ M o menos, más preferiblemente 900 nM o menos, más preferiblemente 800 nM o menos, más preferiblemente 700 nM o menos, más preferiblemente 600 nM o menos, más preferiblemente 500 nM o menos, más preferiblemente 400 nM o menos, más preferiblemente 300 nM o menos, más preferiblemente 200 nM, incluso más preferiblemente 100 nM o menos, incluso más preferiblemente 90 nM o menos, incluso más preferiblemente 80 nM o menos, incluso más preferiblemente 70 nM o menos, incluso más preferiblemente 60 nM o menos, incluso más preferiblemente 50 nM o menos, incluso más preferiblemente 40 nM o menos, incluso más preferiblemente 30 nM o menos, incluso más preferiblemente 20 nM o menos, e incluso más preferiblemente 10 nM o menos.

El término "unión" de acuerdo con la invención se refiere preferiblemente a una unión específica. "Unión específica" significa que una unidad estructural de unión (por ejemplo, un anticuerpo) se une más fuerte a un objetivo tal como un epítipo para el cual es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Una unidad estructural de unión se une más fuerte a un primer objetivo comparado con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_d) que es inferior a la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferiblemente, la constante de disociación (K_d) para el objetivo al que se une específicamente la unidad estructural de unión es más de 10 veces, preferiblemente más de 20 veces, más preferiblemente más de 50 veces, incluso más preferiblemente más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (K_d) para el objetivo al que la unidad estructural de unión no se une específicamente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término " K_d " (medido en "mol/L", a veces abreviado como "M") se refiere a la constante de equilibrio de disociación de la interacción particular entre una unidad estructural de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) y una molécula objetivo (por ejemplo, un antígeno o un epítipo del mismo).

Un "epítipo", también conocido como determinante antigénico, es la parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, células B o células T. Como se usa en la presente memoria, un "epítipo" es la parte de una macromolécula capaz de unirse a una unidad estructural de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno) como se describe en el presente documento. En este contexto, el término "unión" se refiere preferiblemente a una unión específica. Los epítopos consisten usualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen por el hecho de que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo de una macromolécula lineal (por ejemplo, un polipéptido) que está formado por la estructura tridimensional de dicha macromolécula. En el contexto de la presente solicitud, un "epítipo conformacional" es un "epítipo discontinuo", es decir, el epítipo conformacional en la macromolécula (por ejemplo, un polipéptido) que se forma a partir de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la macromolécula (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido). En otras palabras, se considera que un epítipo es un "epítipo conformacional" en el contexto de la presente invención, si el epítipo consta de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria a la que una unidad estructural de unión de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno) se une simultáneamente, en donde estas al menos dos regiones separadas están interrumpidas por una región más en la secuencia primaria a la que no se une una unidad estructural de unión de la invención. Preferiblemente, dicho "epítipo conformacional" está presente en un polipéptido, y las dos regiones separadas en la secuencia primaria son dos secuencias separadas de aminoácidos a las que se une una unidad estructural de unión de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno), en donde estas al menos dos secuencias separadas de aminoácidos están interrumpidas por una secuencia más de aminoácidos en la secuencia primaria a la que no se une una unidad estructural de unión de la invención. Preferiblemente, la secuencia de interrupción de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende dos o más aminoácidos a los que la unidad estructural de unión no se une. Las al menos dos secuencias separadas de aminoácidos a las que se une una unidad estructural de unión de la invención no están particularmente limitadas con respecto a su longitud. Tal secuencia separada de aminoácidos puede consistir en sólo un aminoácido siempre y cuando el número total de aminoácidos dentro de dichas al menos dos secuencias separadas de aminoácidos sea suficientemente grande para efectuar la unión específica entre la unidad estructural de unión y el epítipo conformacional.

Un "parátipo" es la parte de un anticuerpo que reconoce el epítipo. En el contexto de la presente invención, un "parátipo" es la parte de una unidad estructural de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno) como se describe en la presente memoria que reconoce al epítipo.

El término "anticuerpo" se refiere típicamente a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción del mismo de unión a antígeno. El término "anticuerpo" también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento de anticuerpo de unión al antígeno y derivados como se describe a continuación. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH o V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL o V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino hasta el extremo terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huéspedes, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión"), tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y colaboradores, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones aisladas determinantes de complementariedad (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite ser elaborados como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y colaboradores (1988) Science 242: 423-426; y Huston y colaboradores (1988) Proc. Natl. Acad. USA 85: 5879 - 5883). Tales anticuerpos de cadena única también están abarcados en el término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprende (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de la región de bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de

fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad en la misma forma que los anticuerpos intactos. Otros ejemplos de "fragmentos de unión al antígeno" son los llamados microanticuerpos, que son derivados de CDR individuales. Por ejemplo, Heap y colaboradores, 2005, describen un microanticuerpo de 17 residuos de aminoácidos derivado de un CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo dirigido contra la glicoproteína de la envoltura de gp120 de HIV-1. Otros ejemplos incluyen pequeños miméticos de anticuerpos que comprenden dos o más regiones de CDR que se fusionan entre sí, preferiblemente por regiones marco afines. Tal mimético de anticuerpo pequeño que comprende CDR1 de V_H y CDR3 de V_L unidas por el FR2 de V_H afín ha sido descrito por Qiu y colaboradores, 2007.

Por lo tanto, el término "anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. También están comprendidas proteínas de tipo inmunoglobulina que se seleccionan a través de técnicas que incluyen, por ejemplo, expresión en fagos para unirse específicamente a una molécula objetivo o epítipo objetivo, por ejemplo, al epítipo conformacional de C5a humana formada por las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3, o el epítipo conformacional de C5a humana formado por las secuencias de aminoácidos DETCEQR (SEQ ID NO: 4) y KDM. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo IgG1, IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o una subclase de la molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión al antígeno utilizables en la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos son de origen humano, chimpancé, roedor (por ejemplo, ratón, rata, conejillo de indias o conejo), pollo, pavo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, burro, gato o perro). Se prefiere particularmente que los anticuerpos sean de origen humano o murino. Los anticuerpos de la invención también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferiblemente humana, se combina con el sitio de unión al antígeno derivado de otra especie, por ejemplo de ratón. Además, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana (por ejemplo, de ratón) se combinan con regiones constantes y marco de origen humano.

Como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos de la invención se pueden obtener directamente a partir de hibridomas que expresan el anticuerpo, o se pueden clonar y expresar de forma recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son microorganismos, tales como *E. coli*, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse de forma recombinante en un animal no humano o planta transgénicos.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra especie o clase. Típicamente, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivadas de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones celulares humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la especificidad no es afectada por la fuente, la región constante que es humana es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que lo que sería la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde la estructura restante de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender tanto dominios variables completos fusionados en dominios constantes o sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene todas las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que se alteran con respecto al anticuerpo original.

Diferentes métodos para humanizar los anticuerpos son conocidos por el experto en la materia, según lo revisado por Almagro & Fransson, 2008. El artículo de revisión de Almagro & Fransson se resume brevemente a continuación. Almagro & Fransson distinguen entre enfoques racionales y enfoques empíricos. Los enfoques racionales se caracterizan por generar pocas variantes del anticuerpo manipulado y evaluar su unión o cualquier otra propiedad de

interés. Si las variantes diseñadas no producen los resultados esperados, se inicia un nuevo ciclo de diseño y evaluación de la unión. Los enfoques racionales incluyen injerto de CDR, renovación de la superficie, superhumanización y optimización del contenido de hebras humanas. Por el contrario, los enfoques empíricos se basan en la generación de grandes bibliotecas de variantes humanizadas y en la selección de los mejores clones utilizando tecnologías de enriquecimiento o cribado de alto rendimiento. Por consiguiente, los enfoques empíricos dependen de un sistema de selección y/o cribado confiable que sea capaz de buscar a través de un vasto espacio de variantes de anticuerpos. Las tecnologías de expresión *in vitro*, tales como expresión en fagos y expresión en ribosomas, cumplen estos requisitos y son bien conocidas por el experto en la materia. Los enfoques empíricos incluyen las bibliotecas de FR, selección guiada, transposición del marco y la manipulación humana.

Injerto de CDR

Un protocolo de injerto de CDR típicamente comprende tres puntos de toma de decisión: (1) definición de regiones que determinan la especificidad del anticuerpo donante, es decir, el objetivo para el injerto, (2) la identificación de una fuente de secuencias humanas que se utilizan como donantes de FR, y (3) selección de residuos fuera de la región que define la especificidad, es decir, determinación de las posiciones de los aminoácidos que son objetivos para la nueva mutación para restaurar o mejorar la afinidad del anticuerpo humanizado.

(1) Regiones que determinan la especificidad del anticuerpo

La estructura experimental del anticuerpo no humano en complejo con el antígeno proporciona un mapa detallado de residuos en contacto con el antígeno y por lo tanto los responsables de determinar su especificidad. La información estructural se puede complementar con mutagénesis de barrido de alanina y/o mutagénesis combinatoria para identificar los residuos que contribuyen más a la energía de unión o al parátipo funcional. Dado que el parátipo funcional es un subconjunto de los residuos en contacto, injertar sólo el parátipo funcional reduciría el número de residuos no humanos en el producto humanizado. Sin embargo, sólo en casos raros la estructura experimental del complejo antígeno-anticuerpo y/o el parátipo funcional están disponibles al inicio de un protocolo de humanización. En ausencia de una definición precisa de residuos responsables de una determinada especificidad de anticuerpo, a menudo se emplean CDR como regiones que definen la especificidad. También es posible utilizar una combinación de CDR y un bucle de HV como objetivos para el injerto. Para reducir el número de residuos a injertar en las FR humanas, se ha descrito el injerto de SDR, es decir, el injerto de residuos determinantes de especificidad (SDR).

(2) Fuente de FR humanas

La segunda etapa en un protocolo de injerto de CDR típico es identificar donantes de FR humanas. Los trabajos iniciales utilizaron FR de anticuerpos humanos de estructura conocida, independientemente de su homología con el anticuerpo no humano. Este enfoque es conocido como "método de FR fija". Trabajos posteriores usaron secuencias humanas que tenían la homología más alta con el anticuerpo no humano. Este enfoque se ha denominado "Mejor Ajuste". Mientras que las estrategias de "mejor ajuste" tienden a producir anticuerpos con mayor afinidad, otros parámetros tales como la baja inmunogenicidad y los rendimientos de producción también deben tenerse en cuenta al escoger una FR para humanización. Por lo tanto, también son posibles combinaciones de "mejor ajuste" y "FR fija". Por ejemplo, la parte V_L puede ser humanizada de acuerdo con el método de FR fija y la parte V_H puede humanizarse de acuerdo con el método de mejor ajuste, o viceversa.

Se han utilizado dos fuentes de secuencias humanas: secuencias maduras y germinales. Las secuencias maduras, que son productos de respuestas inmunes, portan mutaciones somáticas generadas por procesos aleatorios y no están bajo la selección de especies, dando como resultado residuos inmunogénicos potenciales. Por lo tanto, para evitar residuos inmunogénicos, los genes de la línea germinal humana han sido cada vez más utilizados como fuente de donantes de FR. Las secuencias de nucleótidos de FR de la línea germinal humana se describen por ejemplo en los Apéndices A y B del artículo de Dall'Acqua y colaboradores, 2005. Además, los anticuerpos basados en genes de línea germinal tienden a ser más flexibles en comparación con los anticuerpos maduros. Se cree que esta mayor flexibilidad acomoda mejor las diversas CDR con menos o ninguna retromutaciones en la FR para restablecer la afinidad del anticuerpo humanizado.

(3) Retromutaciones para restaurar o mejorar la afinidad

Comúnmente, la afinidad disminuye después del injerto de CDR como consecuencia de las incompatibilidades entre las CDR no humanas y las FR humanas. Por lo tanto, la tercera etapa en un protocolo típico de injerto de CDR es definir mutaciones que restaurarían o evitarían pérdidas de afinidad. Las retromutaciones tienen que ser cuidadosamente diseñadas con base en la estructura o un modelo del anticuerpo humanizado y probadas experimentalmente. Un sitio web para el modelado automatizado de anticuerpos llamado WAM puede encontrarse en la URL <http://antibody.bath.ac.uk>. El software para el modelado de estructuras de proteína se puede descargar en los sitios <http://salilab.org/modeller/modeller.html> (Modeller) y <http://spdbv.vital-it.ch> (Swiss PdbViewer).

Renovación de la superficie

La renovación de la superficie es similar al injerto de CDR y comparte los dos primeros puntos de toma de decisiones. En contraste con el injerto de CDR, la renovación de la superficie retiene los residuos no expuestos del anticuerpo no humano. Sólo los residuos superficiales en el anticuerpo no humano se cambian por residuos humanos.

5 Superhumanización

Mientras que el injerto de CDR se basa en la comparación de FR entre las secuencias humanas y no humanas, la superhumanización se basa en una comparación de CDR de modo que la homología de FR es irrelevante. El enfoque incluye una comparación de la secuencia no humana con el repertorio de genes de la línea germinal humana funcional. A continuación se seleccionan los genes que codifican las mismas estructuras canónicas o estrechamente relacionadas con las secuencias murinas. A continuación, dentro de los genes que comparten las estructuras canónicas con el anticuerpo no humano, los que tienen mayor homología dentro de las CDR se eligen como donantes de FR. Finalmente, se injertan las CDR no humanas en estas FR.

15 Optimización del contenido de hebras humanas

Este enfoque se basa en una métrica de "humanidad" de los anticuerpos, denominada contenido de hebras humanas (HSC). En resumen, este enfoque compara la secuencia del ratón con el repertorio de genes de la línea germinal humana. Las diferencias se califican como HSC. La secuencia objetivo se humanizan luego mediante la maximización de su HSC en lugar de utilizar una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas.

Bibliotecas de marcos (abreviadas: bibliotecas de FR)

En el enfoque de la biblioteca de FR, se introduce una colección de variantes de residuos en posiciones específicas en la FR, seguido por la exploración de la biblioteca para seleccionar la FR que mejor soporte la CDR injertada. Por lo tanto, este enfoque se asemeja al injerto de CDR, pero en lugar de crear algunas retromutaciones en la FR, se construye una biblioteca combinatoria de típicamente más de 100 variantes mutacionales.

Selección Guiada

Este enfoque incluye combinar el dominio V_H o V_L de un anticuerpo no humano específico dado para un antígeno particular con una biblioteca de V_H y V_L humana. Posteriormente, se seleccionan dominios V humanos específicos contra el antígeno de interés. Por ejemplo, un anticuerpo no humano puede humanizarse combinando primero el V_H no humano con una biblioteca de cadenas ligeras humanas. La biblioteca se selecciona luego contra el antígeno objetivo mediante expresión en fagos y la V_L seleccionada se clona en una biblioteca de cadenas V_H humanas y se selecciona contra el antígeno objetivo. También es posible comenzar con la combinación de la V_L no humana con una biblioteca de cadenas pesadas humanas. La biblioteca se selecciona luego contra el antígeno objetivo por expresión en fagos y se clona la V_H seleccionada en una biblioteca de cadenas V_L humanas y se selecciona contra el antígeno objetivo. En consecuencia, se puede aislar un anticuerpo totalmente humano con afinidad similar a la del anticuerpo no humano. Para evitar la aparición de una deriva de epítomos, es posible implementar la denominada ELISA de inhibición, que permite la selección de clones que reconocen el mismo epítipo que el anticuerpo progenitor. Alternativamente, la retención de CDR se puede aplicar para evitar una deriva de epítomos. En la retención de CDR, se conservan una o más CDR no humanas, preferiblemente la CDR3 de cadena pesada, ya que esta CDR está en el centro del sitio de unión al antígeno.

Transposición del marco (abreviado: transposición de FR)

En el enfoque de transposición de FR, las FR completas se combinan con las CDR no humanas. Utilizando transposición de FR, Dall'Acqua y colaboradores humanizaron un anticuerpo murino. Las seis CDR del anticuerpo murino se clonaron en una biblioteca que contenía todos los FR del gen de la línea germinal humana (Dall'Acqua y colaboradores, 2005). Las bibliotecas se cribaron para la unión en un proceso de selección en dos etapas, primero humanizando V_L , seguido por V_H . En un estudio posterior, se utilizó con éxito un proceso de transposición de FR de una etapa (Damschroder y colaboradores, 2007). Las secuencias de oligonucleótidos que codifican todos los marcos conocidos de cadena ligera germinal humana (κ) se describen en Dall'Acqua y colaboradores, 2005, como Apéndice A. Las secuencias de oligonucleótidos que codifican todos los marcos conocidos de cadena pesada de línea germinal humana se describen en Dall'Acqua y colaboradores, 2005, en el Apéndice B.

Humanización de anticuerpos

La humanización de anticuerpos permite el aislamiento de anticuerpos que son 91-96% homólogos a los anticuerpos del gen de línea germinal humana. El método se basa en la identificación experimental de determinantes esenciales de especificidad mínima (MSD) y en el reemplazo secuencial de fragmentos no humanos en bibliotecas de FR humanas y en la evaluación de la unión. Comienza con regiones de la CDR3 de cadenas V_H y V_L no humanas y reemplaza progresivamente otras regiones del anticuerpo no humano en las FR humanas, incluyendo CDR1 y CDR2 tanto de V_H como de V_L .

Los métodos para humanización de anticuerpos explicados anteriormente son preferidos cuando se generan anticuerpos humanizados que se unen específicamente a los epítopos conformacionales descritos en la presente memoria. No obstante, la presente invención no se limita a los métodos antes mencionados para humanización de anticuerpos.

Algunos de los métodos de humanización antes mencionados pueden realizarse sin información sobre las secuencias de FR en el anticuerpo donante, concretamente el "método de FR fijo" (una variante del injerto de CDR), superhumanización, transposición del marco y humanización de anticuerpos. Las variaciones del "método de FR fijo" fueron llevadas a cabo con éxito por Qin y colaboradores, 2007 y Chang y colaboradores, 2007. En particular, Qin y colaboradores construyeron un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada humana en la que las tres regiones CDR fueron reemplazadas por péptidos antigénicos, que se derivaron de las secuencias de CDR de un anticuerpo murino. Chang y colaboradores continuaron estos experimentos y construyeron un fragmento scFv, en el que todas las CDR de la parte V_H y CDR3 de la parte V_L fueron reemplazadas por péptidos antigénicos, que se derivaron de las secuencias de CDR de un anticuerpo murino.

Tal como se usa en la presente memoria, los "anticuerpos humanos" incluyen anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Los anticuerpos humanos de la invención incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe por ejemplo en la patente estadounidense No. 5.939.598 de Kucherlapati y Jakobovits.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En una realización, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza aquí, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", tal como se usa en la presente memoria, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en un organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligera y pesada de diferentes orígenes de organismos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera de murino es un anticuerpo heterohíbrido.

Por lo tanto, "anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión al antígeno" adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, recombinantes, heterólogos, heterohíbridos, quiméricos, humanizados (en particular injertados a CDR), desinmunizados, o humanos, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, Fd, Fv, Fv unidos a disulfuro (dsFv), anticuerpos de una sola cadena (por ejemplo, ScFv), diacuerpos o tetracuerpos (Holliger P. y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (14), 6444-6448), nanocuerpos (también conocidos como anticuerpos de un solo dominio), anticuerpos antiidiotípicos (anti-id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-id a anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria están preferiblemente aislados. Un "anticuerpo aislado" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a C5a está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de C5a). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de C5a humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies C5a,

tales como C5a de rata). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que tienen diferentes especificidades y que se combinan en una composición bien definida.

- 5 El término "de origen natural", tal como se usa en la presente memoria, aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislada de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "proteína similar a un anticuerpo" se refiere a una proteína que ha sido modificada genéticamente (por ejemplo por mutagénesis de bucles) para unirse específicamente a una molécula objetivo. Típicamente, tal proteína similar a un anticuerpo comprende al menos un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamiaje de proteína. Esta doble restricción estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión de la proteína similar a anticuerpo a niveles comparables a los de un anticuerpo. La longitud del bucle peptídico variable típicamente consiste en 10 a 20 aminoácidos. La proteína de andamiaje puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. Preferiblemente, la proteína de andamiaje es una proteína globular pequeña. Las proteínas similares a anticuerpos incluyen, sin limitación, anticuerpos, anticalinas y proteínas diseñadas de repeticiones de anquirina (para revisión véase: Binz HK y colaboradores (2005). Engineering novel binding proteins from non-immunoglobulin domains. Nat. Biotechnol. 23 (10): 1257-1268). Las proteínas similares a anticuerpos pueden derivarse de grandes bibliotecas de mutantes, por ejemplo, se pueden extraer de grandes bibliotecas de expresión en fagos y se pueden aislar en analogía con anticuerpos regulares. También, se pueden obtener proteínas de unión similares a anticuerpos mediante mutagénesis combinatoria de residuos expuestos de la superficie en proteínas globulares. Las proteínas similares a anticuerpos se denominan a veces "aptámeros peptídicos".
- 20 Las "sustituciones conservadoras" pueden hacerse, por ejemplo, con base en la similitud en polaridad, carga, tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos de aminoácidos implicados. Los aminoácidos pueden agruparse en los siguientes seis grupos de aminoácidos estándar:
- 30 (1) hidrófobo: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrófilico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) ácido: Asp, Glu;
 (4) básico: His, Lys, Arg;
 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
 (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.
- 35 Como se usa en la presente memoria, las "sustituciones conservadoras" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido listado dentro del mismo grupo de los seis grupos de aminoácidos estándar mostrados anteriormente. Por ejemplo, el intercambio de Asp por Glu retiene una carga negativa en el polipéptido así modificado. Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse entre sí con base en su capacidad para interrumpir las hélices α .
- 40 Algunas sustituciones conservadoras preferidas dentro de los seis grupos anteriores son intercambios dentro de los siguientes subgrupos: (i) Ala, Val, Leu e Ile; (ii) Ser y Thr; (iii) Asn y Gln; (iv) Lys y Arg; y (v) Tyr y Phe. Dado el conocimiento del código genético y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el experto en la materia puede fácilmente construir ADN que codifiquen las variantes conservadoras de aminoácidos.
- 45 Tal como se usa en la presente memoria, las "sustituciones no conservadoras" o "intercambios no conservadores de aminoácidos" se definen como intercambios de un aminoácido por otro aminoácido listado en un grupo diferente de los seis grupos de aminoácidos estándar (1) a (6) mostrados anteriormente.
- 50 Una "actividad biológica" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier actividad que un polipéptido pueda exhibir, incluyendo sin limitación: actividad enzimática; actividad de unión a otro compuesto (por ejemplo, unión a otro polipéptido, en particular unión a un receptor, o unión a un ácido nucleico); actividad inhibidora (por ejemplo actividad inhibidora de la enzima); actividad activadora (por ejemplo actividad activadora de enzimas); o efectos tóxicos. Con respecto a las variantes y derivados de un polipéptido, no se requiere que la variante o derivado exhiba tal actividad en la misma extensión que el polipéptido progenitor. Una variante se considera como una variante dentro del contexto de la presente solicitud, si exhibe la actividad relevante hasta un grado de al menos 10% de la actividad del polipéptido progenitor. Del mismo modo, un derivado se considera como un derivado dentro del contexto de la presente solicitud, si exhibe la actividad biológica relevante hasta un grado de al menos 10% de la actividad del polipéptido progenitor. La "actividad biológica" relevante en el contexto de la presente invención es una actividad de unión a un epítipo conformacional de C5a humana formado por las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la "actividad biológica" relevante en el contexto de la presente invención es una actividad de unión a un epítipo conformacional de C5a humana formado por las secuencias de aminoácidos DETCEQR (SEQ ID NO: 4) y KDM. Los ensayos para determinar la actividad de unión son conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen ELISA tales como el descrito en la sección de Ejemplos.
- 60 Como se usa en la presente memoria, un "paciente" significa cualquier mamífero o ave que pueda beneficiarse de un tratamiento con la unidad estructural de unión al objetivo descrita en el presente documento. Preferiblemente, un
- 65

"paciente" se selecciona del grupo que consiste en animales de laboratorio (por ejemplo, ratón o rata), animales domésticos (incluyendo, por ejemplo, conejillo de indias, conejo, pollo, pavo, cerdo, oveja, cabra, camello, vaca, caballo, asno, gato o perro), o primates incluyendo chimpancés y seres humanos. Se prefiere particularmente que el "paciente" sea un ser humano.

De acuerdo con el American College of Chest Physicians y la Society of Critical Care Medicine (Bone RC y colaboradores, 1992), "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine". Chest 101 (6): 1644-55)), hay diferentes niveles de sepsis:

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS): Definido por la presencia de dos o más de los siguientes hallazgos:

- Temperatura corporal $<36^{\circ}\text{C}$ (97°F) o $> 38^{\circ}\text{C}$ (hipotermia o fiebre).
- Frecuencia cardíaca > 100 latidos por minuto (taquicardia).
- Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto o, en gas de la sangre, una P_a de CO_2 menor de 32 mm Hg (4,3 kPa) (taquipnea o hipocapnia por hiperventilación).
- Recuento de glóbulos blancos < 4.000 células/ mm^3 o > 12.000 células/ mm^3 ($< 4 \times 10^9$ o 12×10^9 células/L), o mayor de 10% de formas de bandas (glóbulos blancos inmaduros) (Leucopenia, leucocitosis o bandemia).

Sepsis: Se define como SIRS en respuesta a un proceso infeccioso confirmado. Se puede sospechar o probar la infección (por cultivo, tinción o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), o un síndrome clínico patognomónico para la infección. La evidencia específica de la infección incluye los glóbulos blancos (WBC) en fluidos normalmente estériles (como la orina o el líquido cefalorraquídeo (CSF), la evidencia de una víscera perforada (aire libre en la radiografía abdominal o tomografía computarizada, signos de peritonitis aguda), rayos X anormales del pecho (CXR) consistente con neumonía (con opacificación focal), o petequias, púrpura o púrpura fulminante.

Sepsis severa: Se define como sepsis con disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión.

Choque séptico: Se define como sepsis con hipotensión arterial refractaria o anomalías de hipoperfusión a pesar de una reanimación con fluido adecuada. Los signos de hipoperfusión sistémica pueden ser o bien disfunción de órganos terminales o lactato sérico mayor de 4 mmol/dL. Otros signos incluyen oliguria y alteración del estado mental. Los pacientes se definen por tener shock séptico si tienen sepsis más hipotensión después de la resucitación agresiva del fluido (típicamente más de 6 litros o 40 mL/kg de cristaloides).

Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o tejido que crece por medio de una proliferación celular rápida no controlada y continúa creciendo después de que cesen los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran parcial o total falta de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y por lo general forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigno o maligno.

Por "metástasis" se entiende la diseminación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para entrar en la cavidad corporal y los vasos sanguíneos, y luego, después de ser transportadas por la sangre, la infiltración de los órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células tumorales o componentes pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratar", "creación" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno significa lograr uno o más de lo siguiente: (a) reducción de la gravedad y/o duración del trastorno; (b) limitar o prevenir el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o los trastornos que están siendo tratados; (c) inhibición del empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno o los trastornos que están siendo tratados; (d) limitar o prevenir la recurrencia del trastorno o los trastornos en pacientes que han tenido previamente el trastorno o los trastornos; y (e) limitar o prevenir la recurrencia de los síntomas en pacientes que anteriormente eran sintomáticos para el trastorno o los trastornos.

Tal como se usa en la presente memoria, "prevenir", "que previene", "prevención" o "profilaxis" de una enfermedad o trastorno significa impedir que se produzca un trastorno en el sujeto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la "administración" incluye la administración *in vivo*, así como la administración directamente al tejido *ex vivo*, tal como injertos de venas.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr el propósito pretendido. La cantidad eficaz de un agente terapéutico determinado variará con factores tales como la naturaleza del agente, la vía de

administración, el tamaño y la especie del animal para recibir el agente terapéutico, y el propósito de la administración. La cantidad eficaz en cada caso individual puede ser determinada empíricamente por un experto en la técnica según métodos establecidos en la técnica.

5 "Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

10 El término "portador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Una solución salina es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra en forma intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para
15 soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. Los compuestos de la invención se pueden formular como formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

20 Los métodos generalmente conocidos y practicados en los campos de biología molecular, biología celular, química de proteínas y técnicas de anticuerpos se describen completamente en las publicaciones actualizadas continuamente "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook y colaboradores, Cold Spring Harbor); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y colaboradores, Eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Protein Science (J. E. Colligan y colaboradores eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology (J.S. Bonifacino y col., Wiley & Sons) y Current Protocols in Immunology (J. E. Colligan y colaboradores, Eds., Wiley & Sons). Se describen técnicas conocidas relacionadas con cultivo y los medios celulares en "Large Scale Mammalian Cell Culture" (Hu y colaboradores, Curr. Opin., Biotechnol., 8: 148, 1997), "Serum free Media" (K. Kitano, Biotechnol. 17:73, 1991) y "Suspension Culture of Mammalian Cells" (Birch y colaboradores, Bioprocess Technol. 19: 251, 1990).

40 Realizaciones de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los pasajes siguientes se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así definido puede ser combinado con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

50 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una unidad estructural de unión que se une a un epítipo conformacional formado por las secuencias de aminoácidos NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) y SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) de C5a, (secuencias de *Homo sapiens* y *Pan troglodytes*) en donde la unidad estructural de unión se une al menos a un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y con al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3; en donde dicha unidad estructural de unión tiene una constante de unión con C5a con un valor de K_d de 10 nM o menor y exhibe al menos 80% de actividad de bloqueo para un efecto biológico inducido por C5a; y en donde dicha unidad estructural de unión se selecciona del grupo que consiste de: (a) anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión al antígeno; y (b) proteínas similares al anticuerpo, en donde dichas proteínas similares al anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste de anticuerpos, anticualinas, y proteínas diseñadas de repeticiones de anquirina.

60 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con DETCEQR (SEQ ID NO: 4).

En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con HKDMQ (SEQ ID NO: 5), preferiblemente KDM.

65 En realizaciones particularmente preferidas del primer aspecto, la C5a es C5a humana. Por lo tanto, se prefiere que la unidad estructural de unión se una a un epítipo conformacional formado por los aminoácidos NDETCEQRA (SEQ ID

- NO: 2) y SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) de C5a humana. En otras palabras, una unidad estructural de unión de acuerdo con esta realización preferida del primer aspecto se une al mismo tiempo a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 2 corresponde a los aminoácidos 30-38 de C5a humana.
- 5 La SEQ ID NO: 3 corresponde a los aminoácidos 66-72 de C5a humana. La secuencia de aminoácidos de C5a humana se representa en la SEQ ID NO: 1. En realizaciones más preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión se une a al menos uno de los aminoácidos DETCEQR (SEQ ID NO: 4). La SEQ ID NO: 4 corresponde a los aminoácidos 31-37 de C5a humana. En realizaciones más preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión se une a al menos uno de los aminoácidos HKDMQ (SEQ ID NO: 5), más preferiblemente a al menos uno de los aminoácidos KDM.
- 10 La SEQ ID NO: 5 corresponde a los aminoácidos 67-71 de C5a humana; la secuencia KDM corresponde a los aminoácidos 68-70 de C5a humana. En realizaciones particularmente preferidas, la unidad estructural de unión se une al mismo tiempo a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos DETCEQR (SEQ ID NO: 4) y a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos KDM.
- 15 En las realizaciones preferidas del primer aspecto, las dos secuencias que forman el epítipo conformacional (por ejemplo, pares de secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y 3) están separadas por 1-50 aminoácidos contiguos que no participan en la unión la unidad estructural de unión de la invención. A continuación, dichos aminoácidos que no participan en la unión con la unidad estructural de unión de la invención se denominarán como "aminoácidos que no participan de la unión". Las dos secuencias que forman el epítipo conformacional están preferiblemente separadas por
- 20 6-45 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, más preferiblemente por 12-40 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, más preferiblemente por 18-35 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, más preferiblemente por 24-30 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, más preferiblemente por 25-29 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, aún más preferiblemente por 26-28 aminoácidos contiguos que no participan en la unión, y lo más preferiblemente por 27 aminoácidos contiguos que no participan en la unión.
- 25 En las realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión tiene una constante de unión a C5a, preferiblemente C5a humana, con un valor de K_d de 9 nM o menos, preferiblemente 8 nM o menos, más preferiblemente 7 nM o menos, más preferiblemente 6 nM o menos, más preferiblemente 5 nM o menos, más preferiblemente 4 nM o menos, más preferiblemente 3 nM o menos, más preferiblemente 2 nM o menos, e incluso más preferiblemente 1 nM o menos.
- 30 En realizaciones preferidas del primer aspecto, una unidad estructural de unión presenta al menos 85% de actividad de bloqueo, preferiblemente al menos 90% de actividad de bloqueo, más preferiblemente al menos 95% de actividad de bloqueo, para efectos biológicos inducidos por una molécula de C5a, preferiblemente C5a humana. Estas actividades de bloqueo preferidas se refieren a aquellas realizaciones, en donde la unidad estructural de unión comprende un único parátipo que se une a C5a, preferiblemente C5a humana. En realizaciones, en donde la unidad estructural de unión comprende dos o más parátipos específicos de C5a, se logran dichas actividades de bloqueo de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, etc., cuando una molécula de la unidad estructural de unión se pone en contacto con una cantidad de moléculas de C5a igual a la cantidad de parátipos específicos de C5a presentes en la unidad
- 35 estructural de unión. En otras palabras, cuando los parátipos de la unidad estructural de unión del primer aspecto y C5a están presentes en concentraciones equimolares, la unidad estructural de unión de acuerdo con el primer aspecto exhibe al menos 80% de actividad de bloqueo, más preferiblemente al menos 85% de actividad de bloqueo, más preferiblemente al menos 90% de actividad de bloqueo, y más preferiblemente al menos 95% de actividad de bloqueo para efectos biológicos inducidos por C5a. Un efecto biológico preferido para ser bloqueado es la liberación de lisozima inducida por C5a de células de sangre humana. Los ensayos para determinar esta liberación de lisozima inducida por C5a y su bloqueo se describen en la sección de ejemplos.
- 40 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión no inhibe la actividad de CH50 en plasma humano. Los ensayos para determinar la actividad de CH50 son conocidos por el experto en la materia y se describen a continuación en la sección de ejemplos.
- 50 En las realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión no exhibe una actividad de bloqueo sobre al menos un efecto biológico inducido por C5b, preferiblemente la unidad estructural de unión no exhibe una actividad de bloqueo sobre ningún efecto biológico inducido por C5b.
- 55 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión es capaz de reducir la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre humana completa. Los ensayos para medir la producción de IL-8 en sangre completa son conocidos por el experto en la materia y se describirán más adelante en la sección de ejemplos.
- 60 Como se mencionó anteriormente, la unidad estructural de unión se selecciona del grupo que consiste de:
- (a) anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión al antígeno; y (b) proteínas similares al anticuerpo.
- 65 En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, siendo dicho anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados,

anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos desinmunizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados (en particular injertados en CDR), y anticuerpos humanos.

En realizaciones preferidas del primer aspecto, la unidad estructural de unión es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, siendo dicho fragmento seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, Fragmentos Fv, Fs enlazados por disulfuro (dsFv), anticuerpos de un solo dominio (también conocidos como nanocuerpos) y anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv).

En una realización particularmente preferida del primer aspecto, la unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende: (i) una secuencia de CDR3 de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 6; o (ii) una secuencia CDR3 de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 7; en donde la secuencia de CDR3 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende además: (i) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 8; o (ii) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9; en el donde la secuencia de CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento comprende además al menos una de las siguientes secuencias: (i) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; (ii) una secuencia CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11; (iii) una secuencia CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12; (iv) una secuencia CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 13; (v) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14; (vi) una secuencia CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15; (vii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16; o (viii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17; en donde la secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferentemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservadores, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos. Preferiblemente, el número total de estos cambios opcionales en cada una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, es decir, el número total de intercambios, supresiones y adiciones en cada secuencia, es 1 o 2.

En algunas realizaciones del primer aspecto, la unidad estructural de unión es una proteína similar a un anticuerpo, por ejemplo, una proteína similar a un anticuerpo como se ejemplificó anteriormente en la sección "Definiciones".

Una realización preferida del primer aspecto está dirigida a la unidad estructural de unión para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades que implican inflamación aguda tales como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión tales como cardiopatía isquémica, lesión pulmonar aguda, neumonía, rechazo agudo y crónico de injerto en pacientes trasplantados, reacciones de injerto contra huésped, pero también enfermedades que implican tipos crónicos de inflamación tales como enfermedades glomerulares renales tales como glomerulonefritis y otras entidades de insuficiencia renal, Artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes similares tales como la enfermedad de Bechterew, enfermedades tipo lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, crecimiento de tumores o cáncer de órganos sólidos.

En una realización particularmente preferida del primer aspecto, la unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende: (i) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 8; o (ii) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9; en donde la secuencia de CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos. Preferiblemente, el número total de estos cambios opcionales en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, es decir, el número total de intercambios, supresiones y adiciones, es 1 o 2. Preferiblemente, el número total de estos cambios opcionales en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, es decir, el número total de intercambios, supresiones y adiciones, es 1 o 2.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno comprende además al menos una de las siguientes secuencias: (i) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10; (ii) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11; (iii) una secuencia de CDR2 de cadena ligera

de acuerdo con la SEQ ID NO: 12; (iv) una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 13; (v) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14; (vi) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15; (vii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16; o (viii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17; en donde la secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos. Preferiblemente, el número total de estos cambios opcionales en cada una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, es decir, el número total de intercambios, supresiones y adiciones en cada secuencia, es 1 o 2.

En realizaciones preferidas del primer aspecto, un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno exhibe al menos 85% de actividad de bloqueo, preferiblemente al menos 90% de actividad de bloqueo, más preferiblemente al menos 95% de actividad de bloqueo, para efectos biológicos inducidos por una molécula de C5a, preferiblemente C5a humana. Estas actividades de bloqueo preferidas se refieren a aquellas realizaciones, en donde el anticuerpo (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) comprende un único parátipo que se une a C5a, preferiblemente C5a humana. En realizaciones, en donde el anticuerpo (o fragmento del mismo de unión al antígeno) comprende dos o más parátipos específicos de C5a, dichas actividades de bloqueo de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, etc., se logran cuando se pone en contacto una molécula de una unidad estructural de unión con una cantidad de moléculas C5a igual al número de parátipos específicos de C5a presentes en el anticuerpo (o el fragmento del mismo de unión al antígeno). Por ejemplo, un anticuerpo anti-C5a típico del tipo IgG comprende dos parátipos capaces de unirse a C5a, mientras que un anticuerpo anti-C5a típico del tipo IgM comprende diez parátipos capaces de unirse a C5a. Por lo tanto, la actividad de bloqueo de un anticuerpo del tipo IgG debe determinarse poniendo en contacto dicho anticuerpo con C5a en una relación molar de 1:2. La actividad de bloqueo de un anticuerpo del tipo IgM debe determinarse poniendo en contacto dicho anticuerpo con C5a en una relación molar de 1:10. Al elegir estas relaciones molares, los parátipos dentro del anticuerpo y C5a están presentes en concentraciones equimolares. En otras palabras, cuando los parátipos de un anticuerpo (o fragmento del mismo de unión al antígeno) de acuerdo con el primer aspecto y C5a están presentes en concentraciones equimolares, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno exhibe al menos 80% de actividad de bloqueo, preferiblemente al menos 80% de actividad de bloqueo, más preferiblemente al menos 90% de actividad de bloqueo, y más preferiblemente al menos 95% de actividad de bloqueo para efectos biológicos inducidos por C5a. Un efecto biológico preferido que se bloquea es la liberación de lisozima inducida por C5a de células de sangre humana entera. Los ensayos para determinar esta liberación de lisozima inducida por C5a y su bloqueo se describen en la sección de ejemplos.

Una realización preferida del primer aspecto está dirigida al anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno para la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades que involucran inflamación aguda tal como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión tales como cardiopatía isquémica, lesión pulmonar aguda, neumonía, rechazo agudo y crónico de injerto en pacientes trasplantados, reacciones de injerto contra huésped, pero también enfermedades que implican tipos crónicos de inflamación tales como enfermedades glomerulares renales tales como glomerulonefritis y otras entidades de insuficiencia renal, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes similares tales como enfermedad de Bechterew, enfermedades tipo lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, crecimiento de tumores o cáncer de órganos sólidos.

En las realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno comprende uno de los conjuntos de secuencias de CDR3 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada y de CDR1 de cadena pesada como se enumera a continuación en la Tabla 1, en donde cada secuencia de CDR3 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; y en donde cada secuencia de CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos:

Tabla 1: Conjuntos de secuencias CDR de cadena pesada adecuadas para uso en los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención

Símbolo del conjunto de cadena pesada	Secuencia de CDR3	Secuencia de CDR2	Secuencia de CDR1
---------------------------------------	-------------------	-------------------	-------------------

A	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
B	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
C	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
D	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15
E	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 14
F	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 15
G	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 14
H	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15

En realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno comprende uno de los siguientes conjuntos de secuencias de CDR3 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera y de CDR1 de cadena ligera como se listan en la Tabla 2, en donde cada secuencia de CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; y en donde cada secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 y/o supresiones de aminoácidos, 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos:

Tabla 2: Conjuntos de secuencias de CDR de cadena ligera adecuadas para uso en los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención

Como la secuencia de cadena ligera de CDR2 del anticuerpo INab308 (SEQ ID NO: 12) es idéntica a la secuencia de cadena ligera de CDR2 del anticuerpo INab708 (SEQ ID NO : 13), los conjuntos que incluyen la SEQ ID NO: 13 serían redundantes para los conjuntos que incluyen la SEQ ID NO: 12. Por lo tanto, la tabla solamente enlista cuatro conjuntos de secuencias de CDR de cadena ligera.			
Número de conjuntos de cadena ligera	Secuencia de CDR3	Secuencia de CDR2	Secuencia de CDR1
I	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
II	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17
III	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
IV	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17

En las realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno comprende uno de los conjuntos de CDR de cadena pesada A-H enumerados anteriormente en la Tabla 1 y uno de los conjuntos de CDR de cadena ligera I-IV enumerados anteriormente en la Tabla 2, es decir, una de las siguientes combinaciones de conjuntos: A-I, A-II, A-III, A-IV, B-I, B-II, B-III, B-IV, C-I, C-II, C-III, C-IV, D-I, D-II, D-III, D-IV, E-I, E-II, E-III, E-IV, F-I, F-II, F-III, F-IV, G-I, G-II, G-III, G-IV, H-I, H-II, H-III o H-IV, en donde cada secuencia de CDR3 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia de CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; En el que cada secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferiblemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; y en donde cada secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, preferentemente intercambios de aminoácidos conservados, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos.

En las realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno comprende un dominio VH que comprende, esencialmente consiste en o consiste en (i) el dominio VH de INab308 o (ii) el dominio VH de INab708.

Las secuencias de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 que definen los dominios VH de INab308 e INab708 se muestran más adelante en la Tabla 4.

En las realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno comprende un dominio VL que comprende, esencialmente consiste en o consiste en (i) el dominio VL de INab308 o (ii) el dominio VL de INab708.

Las secuencias de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 que definen los dominios VL de INab308 e INab708 se muestran más adelante en la Tabla 4.

En otras realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno comprende un dominio VH y un dominio VL, en donde

- (i) dicho dominio VH comprende, esencialmente consiste en o consiste en el dominio VH de INab308 y dicho dominio VL comprende, esencialmente consiste en o consiste en el dominio VL de INab308; o
- (ii) dicho dominio VH comprende, esencialmente consiste en o consiste en el dominio VH de INab708 y dicho dominio VL comprende, esencialmente consiste en o consiste en el dominio VL de INab708.

En realizaciones preferidas del primer aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR tal como se describe en el presente documento, comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.

La referencia en la presente memoria a un anticuerpo que comprende con respecto a la cadena pesada del mismo una cadena particular, o una región o secuencia particular se refiere preferiblemente a la situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica correspondientemente a la cadena ligera de un anticuerpo.

Las enseñanzas dadas en la presente memoria con respecto a las secuencias específicas de ácido nucleico y aminoácidos, por ejemplo aquellas que se muestran en el listado de secuencias, deben ser interpretadas de modo que se refieran también a modificaciones de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicos y secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias específicas de ácido nucleico. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a C5a, en particular al epítipo conformacional de C5a identificado en el presente documento, y preferiblemente retiene las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente memoria, por ejemplo bloqueando la liberación de lisozima inducida por C5a de células de sangre entera humana y/o reduciendo la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre entera humana.

Los expertos en la técnica apreciarán que en particular las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a C5a. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones especificadas en la presente memoria. Por "altamente homóloga" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones, supresiones o adiciones, se pueden hacer en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden ser modificadas para que muestren una homología sustancial con las regiones específicamente descritas en la presente memoria.

Además, puede ser deseado, de acuerdo con la presente invención, modificar las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, en particular las de las regiones constantes de la cadena pesada humana para adaptar la secuencia a un alotipo deseado, por ejemplo, un alotipo encontrado en la población caucásica.

La presente invención comprende además anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc con el fin de cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden resultar en una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de FcγR y ADCC. Las sustituciones se pueden hacer, por ejemplo, en uno o más de los residuos de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, causando de este modo una alteración en una función efectora mientras se conserva la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, consultar las patentes estadounidenses Nos. 5.624.821 y 5.648.260.

La semivida *in vivo* de los anticuerpos se puede mejorar modificando el epítipo del receptor de salvamento del dominio constante de Ig o un dominio constante semejante al de Ig de modo que la molécula no comprende un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, consultar las patentes estadounidenses Nos. 6.121.022 y 6.194.551. La semivida *in vivo* puede además aumentarse haciendo mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo la treonina por la leucina en la posición 252, sustituyendo la treonina por la serina en la posición 254 o sustituyendo la treonina por la fenilalanina en la posición 256, consultar la patente estadounidense No. 6.227.375.

Además, el patrón de glicosilación de anticuerpos puede modificarse para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de aumentar la afinidad de la región Fc por los receptores de Fc que, a su vez, resultará en una ADCC incrementada de los anticuerpos en presencia de células NK, consultar Shield y colaboradores (2002) JBC, 277: 26733. Además, puede hacerse la modificación de la galactosilación con el fin de modificar la CDC.

Alternativamente, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-C5a, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-C5a modificados resultantes pueden ser cribados para determinar la actividad de unión.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la unidad estructural de unión de acuerdo con el primer aspecto, y además comprende uno o más portadores, diluyentes, excipientes, rellenos, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegrantes, adsorbentes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una unidad estructural de unión de acuerdo con el primer aspecto, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades que implican inflamación aguda tal como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión tales como cardiopatía isquémica, lesión pulmonar aguda, neumonía, rechazo crónico y agudo de injerto en pacientes trasplantados, reacciones de injerto contra huésped, pero también enfermedades que implican tipos crónicos de inflamación tales como enfermedades glomerulares renales tales como glomerulonefritis y otras entidades de insuficiencia renal, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes similares tales como enfermedad de Bechterew, enfermedades del tipo lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, crecimiento tumoral o cáncer de órganos sólidos.

En la práctica de cualquier aspecto de la presente invención, se puede administrar a un paciente una composición farmacéutica como la descrita anteriormente o una unidad estructural de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno) mediante cualquier ruta establecida en la técnica que proporcione un nivel suficiente de la unidad estructural de unión en el paciente. Se puede administrar sistémica o localmente. Dicha administración puede ser en forma parenteral, transmucosa, por ejemplo, en forma oral, nasal, rectal, intravaginal, sublingual, submucosa, transdérmica o por inhalación. Preferiblemente, la administración es parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, y también incluye, pero no se limita a, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica y subcutánea. Si la composición farmacéutica de la presente invención se administra localmente, se puede inyectar directamente en el órgano o tejido a tratar, por ejemplo, en el órgano afectado por un tumor.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden proporcionarse como cápsulas o tabletas; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o derivados del mismo, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sus sales. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

Un agente activo destinado a la administración oral puede ser recubierto o mezclado con un material que retrasa la desintegración y/o absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, se pueden utilizar monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo). De este modo, la liberación sostenida de un agente activo se puede conseguir durante muchas horas y, si es necesario, el agente activo puede protegerse de ser degradado dentro del estómago. Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse para facilitar la liberación de un agente activo en una localización gastrointestinal particular debido al pH específico o a condiciones enzimáticas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden proporcionarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden proporcionarse como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, atomizadores, aerosoles o aceites. Para la administración tópica a la piel, boca, ojos u otros tejidos externos se usa preferentemente un ungüento o crema tópica. Cuando se formula en un ungüento, el ingrediente activo se puede emplear ya sea con una base de ungüento parafínico o miscible con agua. Alternativamente, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica a los ojos incluyen gotas para los ojos. En estas composiciones, el ingrediente activo puede disolverse o suspenderse en un portador adecuado, por ejemplo, en un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal pueden comprender portadores sólidos tales como polvos (preferiblemente con un tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 500 micrómetros). Los polvos se pueden administrar en la forma en que se aspira el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la nariz desde un contenedor para polvo mantenido cerca de la nariz. Alternativamente, las composiciones adoptadas para administración nasal pueden comprender portadores líquidos, por ejemplo, aerosoles nasales o gotas nasales. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las composiciones para la administración por inhalación pueden suministrarse en dispositivos especialmente adaptados que incluyen, pero no limitados a, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden construirse de manera que proporcionen dosificaciones predeterminadas del ingrediente activo. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a través de la cavidad nasal a los pulmones.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden proporcionarse como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden proporcionarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, reguladores, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor deseado. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones adaptadas para administración parenteral pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o múltiples, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en reguladores acuosos isotónicos estériles. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de solución salina estéril para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En otra realización, por ejemplo, puede administrarse un inhibidor de quimioatracción en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el inhibidor puede administrarse mediante infusión intravenosa, una bomba osmótica que puede ser implantada, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (véase Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed Eng. 14: 201 Buchwald y colaboradores (1980) Surgery 88: 507 Saudek y colaboradores (1989) N. Eng. J. Med. 321: 574). En otra realización, el compuesto puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) Science 249: 1527-1533, Treat y colaboradores, (1989) en liposomes in the therapy of infectious disease and cancer, López- Berestein y Fidler (eds.), Liss, NY, 353-365, el documento WO 91/04014, patente estadounidense No. 4.704.355). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release(1974) Langer y Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, FL., Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, (1984) Smolen y Ball (eds.), Wiley: N.Y.; Ranger y Peppas (1953) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véase también Levy y colaboradores (1985) Science 228:190; During y colaboradores (1989) Ann. Neurol. 25: 351; Howard y colaboradores (1989) J. Neurosurg. 71: 105).

En aún otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad del objetivo terapéutico, es decir, las células, tejido u órgano objetivo, requiriendo de este modo sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson (1984) 115-138 en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente a la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a manera de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, por inyección, mediante un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas, o fibras.

La selección de la dosis eficaz preferida será determinada por un experto en la materia con base en la consideración de diversos factores que serán conocidos por un experto en la técnica. Tales factores incluyen la forma particular de la composición farmacéutica, por ejemplo, un polipéptido o vector, y sus parámetros farmacocinéticos tales como biodisponibilidad, metabolismo, semivida, etc., que se habrán establecido durante los procedimientos habituales de desarrollo empleados típicamente en la obtención de la aprobación reguladora para un compuesto farmacéutico. Otros factores en la consideración de la dosis incluyen la afección o enfermedad que debe prevenirse o tratarse o el beneficio que se debe conseguir en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, medicamentos concomitantes, y otros factores bien conocidos que afectan la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Por lo tanto, la dosis precisa debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente, por ejemplo, dependiendo de la condición y el estado inmunitario del paciente individual, de acuerdo con técnicas clínicas estándar.

En la práctica de cualquier aspecto de la presente invención en relación con la prevención y/o el tratamiento del crecimiento de tumores o cáncer de órganos sólidos, el sujeto al que se le administra la unidad estructural de unión o anticuerpo de la invención se trata adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación, o un agente que modula, por ejemplo, aumenta o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo un receptor de Fc-gamma, tal como una citoquina. Las citoquinas típicas para la administración durante el tratamiento incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón y

(IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, taxotere, 5-fluoruracilo, metotrexato, gemcitabina y ciclofosfamida.

Las siguientes figuras y ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención como se indica por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el efecto de mutantes de C5a en la liberación de enzimas a partir de células sanguíneas

Los aminoácidos potenciales en las moléculas de C5a para constitución de epítopos de anticuerpo fueron mutados en alanina, y estos mutantes C5a se ensayaron en cuanto a su bioactividad para inducir liberaciones de lisozima de células de sangre humana entera. La mutación en el sitio de C5a que da como resultado una pérdida de bioactividad de más del 50% en comparación con la C5a humana fue considerada como un sitio crítico para la función biológica de C5a. Estos sitios son 24, 29, 31, 37, 68 y 69.

La Fig. 2 muestra la capacidad de unión de INab308 a mutantes de C5a

C5a y mutantes de C5a fueron colocados en una placa de 96 pozos. Las capacidades de unión de INab308 a estas proteínas se evaluaron mediante el método ELISA. La pérdida de capacidad de unión superior al 50% se considera significativa. Los datos indican que INab308 se une a dos regiones, 31-37 y 68-69.

La Fig. 3 muestra la capacidad de unión de INab708 a mutantes de C5a

C5a y mutantes de C5a se colocaron en una placa de 96 pozos. Las capacidades de unión de INab708 a estas proteínas se evaluaron mediante un procedimiento ELISA. La pérdida de capacidad de unión superior al 50% se considera significativa. Los datos indican que INab708 se une a dos regiones, 31-37 y 68-70.

Fig. 4: INab308 e INab708 no afectan la actividad de CH50 en plasma humano

La actividad hemolítica en plasma humano se determinó mediante el ensayo clásico de CH50. Los Mab para C5a humana que incluyen INab708, INab308 y F20, fueron incubados previamente con plasma humano, y luego se realizó posteriormente el ensayo de CH50. Entre estos anticuerpos, F20 inhibe fuertemente la actividad de CH50, mientras que INab708 e INab308 no tienen influencia cuando se usan a una concentración de aprox. 5 μ M, que es significativamente mayor que la concentración de C5 que se presenta en sangre humana entera (aproximadamente 0,4 μ M).

La Fig. 5 muestra una comparación de los efectos de bloqueo de INab308, INab708 y L2B23 sobre la bioactividad de C5a

La actividad de bloqueo de INab308, INab708 y L2B23 se evaluó mediante el ensayo de liberación de lisozima inducida por C5a. La relación molar de anticuerpo con respecto a C5a se ajustó en 1:2 para evaluar la actividad de bloqueo de un anticuerpo con respecto al efecto biológico provocado por dos moléculas de C5a. Los datos muestran que INab308 e INab708 poseen una actividad de bloqueo muy alta ($\geq 90\%$) para la bioactividad de C5a, mientras que L2B23 sólo muestra un efecto mínimo.

La Fig. 6 muestra el efecto inhibidor de INab308 e INab708 sobre la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre entera humana

Se incubó *E. coli* con sangre entera durante 4 horas, y se evaluaron los niveles de IL-8 mediante ELISA. En presencia de INab308 e INab708 durante la incubación, se atenuaron significativamente los niveles de IL-8 ($P < 0,01$), mientras que no hubo reducción significativa con la presencia de L2B23.

Ejemplos

1. Métodos

1.1 Preparación de C5a recombinante y mutante de C5a:

Se obtuvieron secuencias de ADN que codifican C5a humana mediante reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) usando ARN aislado de leucocitos de sangre periférica. Se generaron mutantes de C5a usando métodos de PCR mediante introducción del GCT (alanina) en el sitio de mutación. Se ligó luego el ADN de C5a con pET-32a (Novagen, Gibbstown, NJ) y se usó la mezcla de ligación para transformar células competentes JM109. Los plásmidos de expresión se transformaron en BL21 usando un método estándar de cloruro de calcio. Se recogió una sola colonia de una placa de cultivo Luria-Bertani (LB), se inoculó en medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C durante la noche. El cultivo se transfirió a 2 litros de medio LB y se incubó a 37°C hasta fase exponencial media ($A_{600} \approx 0,6$), y después se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,1 mM. Se dejó que las células continuaran creciendo a 30°C durante la noche y se recogieron mediante centrifugación del cultivo a 7.000 rpm, 4°C, durante 15 min. Después de lavar con solución salina regulada con fosfato (PBS; PB 10 mM, NaCl 150 mM [pH 7,4]) una vez, el sedimento de bacterias se resuspendió en PBS y se sonizó sobre hielo. Después de la centrifugación a 12.000 rpm, 4°C, durante 15 min, la fracción soluble se separó del sedimento insoluble. Para purificar C5a humana recombinante, el sobrenadante de lisado celular se cargó en una columna de afinidad quelada con níquel equilibrada previamente con PBS. A continuación, la columna se lavó con imidazol 50 mM e imidazol 200 mM en PBS, respectivamente. Finalmente, las proteínas unidas se eluyeron con imidazol 500 mM, se dializaron contra PBS durante la noche y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

1.2 Inmunización y cribado de hibridomas mediante ELISA:

Los anticuerpos monoclonales se prepararon usando métodos de hibridoma. La inmunización y producción de MAb se llevaron a cabo utilizando protocolos estándar. Cinco ratones hembra BALB/c de 4 semanas de edad se inmunizaron subcutáneamente con 100 µg de C5a recombinante purificada en adyuvante de Freund completo por animal. Los animales fueron reforzados dos veces a intervalos de 4 semanas utilizando 100 µg de antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Tres días después del refuerzo final, los ratones fueron sacrificados, y sus esplenocitos se fusionaron con NS-1 en una relación de 5:1, y se sembraron en 5 placas de 96 pozos 200 µL de células en cada pozo. Los híbridos se seleccionaron en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal de ternera al 20% y hipoxantina 5×10^{-3} M, aminopterina 2×10^{-5} M, y timidina 8×10^{-4} M (HAT).

Después de 8 días, se cribaron clones celulares que secretan anticuerpos contra C5a humana mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Brevemente, se revistió una placa de 96 pozos con 2 µg/mL de C5a humana recombinante a 4°C durante la noche. Después de ser bloqueada con leche desnatada al 5% en PBS a 37°C durante 1 h, se añadieron 50 µL de medio de cultivo de los clones en crecimiento a cada pozo y se incubaron a 37°C durante 1 h, seguido de 100 µL de anticuerpo antirratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h. La reacción de peroxidasa se desarrolló con una solución para desarrollo de color que contenía clorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) 5,5 mM y H₂O₂ 8,5 mM. Se midió la absorbancia de luz a 492 nm con un lector de ELISA (Anthos, Wals/Salzburgo, Austria).

1.3 Producción y purificación de anticuerpos monoclonales:

Para producir el Mab en grandes cantidad, se inyectaron 5×10^6 células de hibridoma en la cavidad peritoneal de ratones. Después de 14 días, se retiró la ascitis y se centrifugó a 1500 rpm, 4°C, durante 5 min. El sobrenadante se recogió y se aplicó a una columna de proteína A-Sefarosa 4B, que había sido previamente equilibrada en PBS. Se eluyó el Mab enlazado con ácido cítrico (pH 4,0) y se dializó contra PBS durante la noche. Las proteínas purificadas se analizaron por SDS-PAGE.

1.4 Ensayo de liberación de enzimas para la bioactividad de C5a

La inducción de liberación de enzima por desgranulación es una característica biológica importante de C5a. En nuestro estudio, se usó sangre entera humana fresca de voluntarios sanos para evaluar el efecto de C5a en las liberaciones de lisozima. Los niveles de lisozima liberados por células de sangre entera se analizaron mediante el kit de ensayo de lisozima EnzChek® (Invitrogen, CA, EE.UU.). Para estudiar la actividad de bloqueo de anticuerpos anti-C5a, se mezcló rhC5a (100 nM) con diferentes concentraciones de anticuerpo. A continuación, se añadieron inmediatamente células de sangre entera para evitar la incubación previa de anticuerpos con C5a. Después de la incubación, se añadieron 50 µL de los sobrenadantes de la muestra a 50 µL de solución diluida de sustrato. Se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos en la oscuridad y se leyó después con un contador de etiquetas múltiples Perkin Elmer 1420 (Massachusetts, EE.UU.). Se midió la intensidad de la fluorescencia con una excitación a 490 nm y una emisión a 525 nm y se restó el valor del estándar cero (blanco) de todas las muestras. Se calculó la actividad de bloqueo del anticuerpo después de restar la intensidad de fluorescencia de la liberación de lisozima independiente de rhC5a (control del regulador) de la intensidad de la fluorescencia de la liberación de lisozima inducida por rhC5a. Se calculó la actividad de bloqueo con la siguiente fórmula, actividad de bloqueo = $\frac{C5a_{\text{Fluorescencia}} - (C5a+Ab)_{\text{Fluorescencia}}}{C5a_{\text{Fluorescencia}} - \text{Control del regulador Fluorescencia}}$.

1.5 Análisis ELISA de la capacidad de unión de INab308 e INab708 con C5a humana o mutantes de C5a

Se llevó a cabo un ELISA de unión para determinar las actividades de unión de INab308 e INab708 con C5a humana o mutantes de C5a. Se produjeron mutantes de C5a sustituyendo el aminoácido correspondiente por alanina mediante la introducción de GCT en el sitio de mutación a partir del nivel de ADNc. Estos mutantes de C5a incluyen la mutación en el sitio 24, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, mutación doble 30/37, 40, 53, 64, 65, 66, 68, 64/68, 66/68, 69, 70 y C-del (se suprimieron 12 aminoácidos del extremo terminal C de 5aC).

Se colocaron C5a humana (Sigma C5788), C5a recombinante y mutantes de C5a (2 µg/ml) en una placa EIA de 96 pozos (Costar 9018) a 4°C durante la noche. Después de ser bloqueada con leche desnatada al 5% en PBS a 37°C durante 1 h, se añadieron 0,08; 0,4; 2 µg/mL de anticuerpos anti-C5a (INab308 e INab708) preparados con regulador de dilución a cada pozo y se incubó a 37°C durante 1 h, seguido de 100 µL de anticuerpo antirratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h. Se desarrolló la reacción de peroxidasa con una solución para desarrollo de color que contenía clorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) 5,5 mM y H₂O₂ 8,5 mM. Se midió la absorbancia de luz a 492 nm con un lector de ELISA (Anthos, Wals/Salzburgo, Austria). Se fijó el valor de OD para C5a recombinante como 100% de actividad de unión. La capacidad de unión de mutantes C5a se calcula mediante $OD_{\text{mutante de C5a}} / OD_{\text{C5a}}$.

1.6 Actividad hemolítica en plasma (CH50):

En resumen, se prepararon glóbulos rojos de oveja (sRBC) a partir de sangre entera fresca de oveja por centrifugación, y luego se sensibilizaron con anti-sRBC. Se diluyeron en forma seriada muestras de plasma de voluntarios sanos y se incubaron con sRBC sensibilizado. Media hora después de la incubación, las células no lisadas se centrifugaron y los

sobrenadantes se leyeron a 542 nm en un lector de placas. Para determinar el efecto de los anticuerpos anti-C5a sobre la activación de C5, se incubaron previamente volúmenes iguales de anticuerpo anti-C5a y plasma durante 1 hora antes de la adición de sRBC sensibilizado.

5 1.7 Producción de IL-8 en el modelo de sangre entera de infección por E. coli:

10 Para evaluar la eficacia de los anticuerpos anti-C5a en el entorno cercano a la sepsis clínica, se colocaron anticuerpos anti-C5a en 250 µL de sangre entera de voluntarios sanos y se añadieron luego 250 µL de E. coli diluido en regulador salino con una concentración de 1×10^7 /ml. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se centrifugaron los sobrenadantes y se recogieron para análisis mediante ELISA de IL-8. Se analizaron los niveles de IL-8 en los sobrenadantes mediante el kit de ELISA para IL-8 (BioLegend, EE.UU.).

1.8 Ensayo para cribar anticuerpos que se unen al nuevo epítipo conformacional:

15 En la estructura tridimensional de C5a obtenida a partir del método de modelación informática, se pueden observar los epítopos espaciales que contienen al péptido C5a 28-40 (VNNDTCEQRAAR, SEQ ID NO: 67) y al péptido C5a 65-70 (ISHKDM, SEQ ID NO: 68) como espirales aleatorias. Cuando los dos péptidos están enlazados por medio de un enlazador peptídico flexible, GGGGS (SEQ ID NO: 69), se reconstruyen los epítopos espaciales asemejándose a la conformación del antígeno progenitor, ya que la interacción hidrófoba débil de los dos péptidos asegura una conformación con forma de bolsillo. El análisis por modelación informática del péptido NH₂-28-40-Enlazador(GGGGS)-65-70-COOH mantiene la misma conformación que el antígeno progenitor. Este nuevo péptido 24-AA puede ser sintetizado y conjugado con hemocianina de lapa (KLH) para formar un inmunógeno para inmunizar ratones, y puede aplicarse la tecnología de hibridoma tradicional posteriormente para obtener INab308 e INab708 usando el ELISA con base en el nuevo péptido 24-AA como herramienta de cribado.

25 Se recubre una placa de ELISA de 96 pozos con 1-2 µg/mL de péptidos sintéticos con el epítipo conformacional a 4°C durante la noche. Después de haber sido bloqueado con leche desnatada al 5% en PBS a 37°C durante 1 h, se añaden 50 µL de medio de cultivo de los clones de cultivo de hibridoma a cada pozo y se incubó a 37°C durante 1 h, seguido de 100 µL de anticuerpo antirratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h. La reacción de peroxidasa se desarrolla con una solución para desarrollo de color que contiene clorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) 5,5 mM y H₂O₂ 8,5 mM. La absorbancia de luz se mide a 492 nm con un lector de ELISA.

2. Resultados

35 2.1 Identificación de aminoácidos relevantes para la actividad de C5a

Varios aminoácidos dentro de la molécula de C5a que constituyen epítopos de anticuerpos posibles se mutaron en alanina. En particular, los mutantes de C5a incluyen mutaciones en el sitio en 24, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, mutación doble 30/37, 40, 53, 64, 65, 66, 68, 64/68, 66/68, 69, 70 y C-del (se suprimieron 12 aminoácidos del extremo terminal C de C5a). Los mutantes C5a se ensayaron en cuanto a su bioactividad para inducir la liberación de lisozima de células de sangre entera humana (Figura 1).

45 La mutación en el sitio de C5a que resulta en una pérdida de bioactividad de más del 50% en comparación con la C5a humana se consideró como un sitio crítico para la función biológica de C5a. Así, los residuos de aminoácidos 24, 29, 31, 37, 68 y 69 se identificaron como sitios críticos para la función (Figura 1).

2.2 Caracterización de los epítopos sobre C5a unido mediante los anticuerpos INab308 e INab708

50 Se cribaron 2000 clones de células que secretan anticuerpos contra C5a humana con el ensayo funcional (liberación de enzima). Únicamente dos anticuerpos exhibieron actividad superior.

Estos dos anticuerpos, INab308 e INab708, fueron después caracterizados con respecto a los aminoácidos particulares sobre C5a reconocidos por los dos anticuerpos.

55 En particular, se generaron varios mutantes de C5a en los cuales se reemplazaron uno o más aminoácidos por alanina. Los anticuerpos INab308 e INab708 se pusieron en contacto con estos mutantes y se determinó el grado de unión mediante ELISA (véase la sección 1.5 anterior). Se consideró significativa una pérdida de capacidad de unión superior al 50% (en comparación con C5a de tipo silvestre).

60 Los datos indican que INab308 se une a dos regiones, 31-37 y 68-69 (Figura 2). Del mismo modo, INab708 se une a dos regiones, 31-37 y 68-70 (Fig. 3).

Notablemente, las regiones identificadas para ambos anticuerpos cubren cuatro residuos de aminoácidos (31, 37, 68 y 69) que se identificaron como sitios críticos para la función de C5a en la sección 2.1 anterior.

65 2.3 Efecto de los anticuerpos INab308, INab708 y F20 en la actividad hemolítica en plasma humano

El título de complemento hemolítico total (CH50) es un método convencional para la determinación de la activación de la vía clásica del complemento (véase la sección 1.6).

Los anticuerpos monoclonales para C5a (INab708, INab308 y F20) se incubaron previamente con plasma humano a una concentración de aproximadamente 5 μ M, y luego se realizó el ensayo de CH50. Entre estos anticuerpos, F20 inhibe fuertemente la actividad de CH50, mientras que INab708 e INab308 no tienen influencia (Fig. 4).

Estos resultados demuestran que INab708 e INab308 no interfieren con la activación del complemento mediada por C5b.

2.4 Efecto de los anticuerpos INab308, INab708 y L2B23 sobre la bioactividad de C5a

La actividad de bloqueo de los anticuerpos INab308, INab708 y L2B23 en C5a se evaluó mediante ensayo de liberación de lisozima inducida por C5a (véase la sección 1.4). La relación molar de anticuerpo con respecto a C5a se ajustó en 1:2 para evaluar la actividad de bloqueo de un anticuerpo con respecto al efecto biológico provocado por dos moléculas de C5a. Estos anticuerpos son anticuerpos bivalentes. Por consiguiente, eligiendo la relación molar anterior de 1:2, los parátomos de los anticuerpos, por una parte, y C5a, por otra parte, están presentes en concentraciones equimolares.

Los datos de la Fig. 5 muestran que INab308 e INab708 poseen una actividad de bloqueo muy alta con respecto a la bioactividad de C5a (94% y 100%, respectivamente), mientras que L2B23 sólo muestra un efecto mínimo (aproximadamente 12%).

2.5 Efecto de los anticuerpos INab308 e INab708 sobre la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre entera humana

Para evaluar la eficacia de anticuerpos anti-C5a en un entorno cercano a la sepsis clínica, se determinó la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre entera. Este ensayo puede considerarse como un modelo de infección por *E. coli* (véase también la sección 1.7).

En presencia de INab308 e INab708 durante la incubación, los niveles de IL-8 se atenuaron significativamente ($P < 0,01$), mientras que no hubo reducción significativa en presencia de L2B23 (Figura 6).

3. Resumen

Las propiedades importantes de los anticuerpos preferidos de la invención INab308 e INab708 se resumen en la Tabla 3 a continuación. Se incluyen además anticuerpos comparativos 8g8, MAb 137-26, Ab11876, G57, F20, L2B23 y G13 que no se unen simultáneamente a ambas secuencias amino del epítipo conformacional identificado en la presente invención, es decir, secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3. Los anticuerpos comparativos 8g8, MAb 137-26, F20, G57, L2B23 y G13 se unen a sólo una de estas dos secuencias de aminoácidos (8g8, MAb 137-26, F20, G57 y G13) o a una secuencia de aminoácidos diferente (L2B23). El epítipo objetivo de Ab11876 no se conoce.

Tabla 3: Los anticuerpos neutralizantes para C5a y los epítomos

Los anticuerpos monoclonales para C5a humana se generaron usando tecnología clásica de hibridomas. Los sitios de unión de Mab a la C5a humana se determinaron por el método de cribado de alanina. Las actividades de bloqueo de Mab se cuantificaron mediante la inhibición de las liberaciones de lisozima inducidas por C5a de células de sangre entera humana.				
Anticuerpo	Sitios de unión	Afinidad (Kd: nM)	Relación de Ab respecto a C5a	Actividad de bloqueo
INab308	31-37,68-69	0,50	1/2:1	$\geq 90\%$
INab708	31-37, 68-70	0,51	1/2:1	$\geq 90\%$
8g8	69-74	0,27	1/2:1	60%
MAb 137-26*	35-46	0,06	1/2:1	55%
Ab11876**	ND	ND	4:1	40%
G57	31-37	ND	4:1	40%
F20	68-69	7,06	10:1	70%
L2B23	64-66	ND	10:1	50%
G13	53, 66-68	ND	10:1	60%

ND: No determinado; *ATCC clon No. PTA-3650 con respecto a un anticuerpo divulgado en la solicitud de patente europea 1 878 441 A2; **Ab11876 es un anticuerpo monoclonal anti-C5/C5a obtenido a través de ABCAM (Cambridge, RU).

Como se muestra en la Tabla 3, algunos anticuerpos comparativos (8g8, MAb 137-26) muestran mayores afinidades de unión a C5a que los anticuerpos preferidos de la invención, INab308 e INab708. Sin embargo, INab308 e INab708 exhiben mayores actividades de bloqueo que cualquier anticuerpo comparativo estudiado. Más específicamente, cada uno de INab308 e INab708 exhibe una actividad de bloqueo muy alta ($\geq 90\%$), incluso cuando se usa en cantidades

estequiométricas, es decir, en una relación de 1 parátipo por 1 epítipo; es decir 0,5 moléculas de anticuerpo por 1 molécula objetivo. Los anticuerpos de la técnica anterior (MAb 137-26, Ab11876) alcanzaron actividades de bloqueo razonables solamente cuando se usan en cantidades superestequiométricas. Estos hallazgos demuestran que una alta afinidad de unión no siempre se puede equiparar con alta actividad de bloqueo.

Resumiendo, la presente invención proporciona por primera vez anticuerpos que exhiben una actividad de bloqueo extremadamente alta, incluso cuando se utiliza sólo en cantidades estequiométricas.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos INab308 e INab708 se enumeran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias de CDR y FR de los anticuerpos INab308 e INab708 (modo de clasificación de Chothia)

INab308:	INab708:
Cadena pesada: FR1: QVQLQQSGPQLVRPGTSVKIS (= SEQ ID NO: 51) CDR1: CKASGYSFTTFWMD (= SEQ ID NO: 14) FR2: WVKQRPGQGLEWIGR (SEQ ID NO: 52) CDR2: IDPSDSESRLDQ (= SEQ ID NO: 10) FR3: RFKDRATLTVDKSSSTVYMQLSPTSSED SAVYY (SEQ ID NO: 53) CDR3: CARGNDGYGFAY (= SEQ ID NO: 6) FR4: WGQGLTVTVSSA (SEQ ID NO: 54)	Cadena pesada: FR1: VQLLESGAELMKPGASVKIS (SEQ ID NO: 59) CDR1: CKATGNTFSGYWIE (= SEQ ID NO: 15) FR2: WVKQRPGHGLEWIGE (SEQ ID NO: 60) CDR2: ILPGSGSTNYNE (= SEQ ID NO: 11) FR3: KFKGKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSED SAVYY (SEQ ID NO: 61) CDR3: CTRRGLYDGSSYFAY (= SEQ ID NO: 7) FR4: WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 62)
Cadena ligera: FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 55) CDR1: CKASQSVDDYDGDSYMK (= SEQ ID NO: 16) FR2: WYQQKPGQPPKLL (SEQ ID NO: 56) CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 12) FR3: QSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDA ATYY (SEQ ID NO: 57) CDR3: CQQSNEDPYT (= SEQ ID NO: 8) FR4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 58)	Cadena ligera: FR1: DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS (SEQ ID NO: 63) CDR1: CKASQSVDDYDGDSYMN (= SEQ ID NO: 17) FR2: WYQQKPGQPPKLL (SEQ ID NO: 64) CDR2: IYAASNL (= SEQ ID NO: 13) FR3: GSGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEVA ATYY (SEQ ID NO: 65) CDR3: CQQNNEPLT (= SEQ ID NO: 9) FR4: FGAGTLLELK (SEQ ID NO: 66)

Referencias

Allegretti M, Moriconi A, Beccari AR, Di Bitondo R, Bizzarri C, Bertini R, y Colotta F. 2005. Targeting C5a: recent advances in drug discovery. *Curr Med Chem* 12(2): 217-236.

Bengtson A, and Heideman M. 1988. Anaphylatoxin formation in sepsis. *Arch Surg* 123(5): 645-649.

Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, y Ward PA. 1999. Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5(7): 788-792.

Guo RF, Huber-Lang M, Wang X, Sarma V, Padgaonkar VA, Craig RA, Riedemann NC, McClintock SD, Hlaing T, Shi MM y otros. 2000. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J Clin Invest* 106(10): 1271-1280.

Guo RF, Riedemann NC, Laudes IJ, Sarma VJ, Kunkel RG, Dilley KA, Paulauskis JD, y Ward PA. 2002. Altered neutrophil trafficking during sepsis. *J Immunol* 169(1): 307-314.

Guo RF, Riedemann NC, Sun L, Gao H, Shi KX, Reuben JS, Sarma VJ, Zetoune FS, y Ward PA. 2006a. Divergent signaling pathways in phagocytic cells during sepsis. *J Immunol* 177(2): 1306-1313.

Guo RF, Sun L, Gao H, Shi KX, Rittirsch D, Sarma VJ, Zetoune FS, y Ward PA. 2006b. In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. *J Leukoc Biol* 80(6): 1575-1583.

Guo RF, y Ward PA. 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23: 821-852.

Hopken U, Mohr M, Struber A, Montz H, Burchardi H, Gotze O, y Oppermann M. 1996. Inhibition of interleukin-6 synthesis in an animal model of septic shock by anti-C5a monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 26(5): 1103-1109.

- Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R y otros. 2001 a. Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 166(2): 1193-1199.
- 5 Huber-Lang MS, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Younkin EM, Laudes IJ, Riedemann NC, Younger JG y otros. 2001b. Protective effects of anti-C5a peptide antibodies in experimental sepsis. *FASEB J* 15(3): 568-570.
- 10 Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Cumutte JT, Erickson R, y Ward PA. 2002. Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J Immunol* 169(6): 3223-3231.
- Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, y Kohl J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46(14): 2753-2766.
- 15 Laudes IJ, Chu JC, Sikrath S, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann N, Sarma JV, Schmaier AH, y Ward PA. 2002. Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am J Pathol* 160(5): 1867-1875.
- 20 Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, y Lambris JD. 2008. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol* 9(11): 1225-1235.
- Nakae H, Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kasai T, y Yoshida M. 1994. Serum complement levels and severity of sepsis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 84(2): 189-195.
- 25 Nakae H, Endo S, Inada K, y Yoshida M. 1996. Chronological changes in the complement system in sepsis. *Surg Today* 26(4): 225-229.
- Riedemann NC, Guo RF, Bernacki KD, Reuben JS, Laudes IJ, Neff TA, Gao H, Speyer C, Sarma VJ, Zetoune FS y colaboradores. 2003. Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis. *Immunity* 19(2): 193-202.
- 30 Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, Wetzel RA, Zetoune FS, y Ward PA. 2004a. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol* 173(2): 1355-1359.
- 35 Riedemann NC, Guo RF, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, Speyer CL, Sarma JV, Wetzel RA, Zetoune FS y colaboradores. 2004b. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J* 18(2): 370-372.
- Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL y colaboradores. 2002a. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* 110(1): 101-108.
- 40 Riedemann NC, Guo RF, Sarma VJ, Laudes IJ, Huber-Lang M, Warner RL, Albrecht EA, Speyer CL, y Ward PA. 2002b. Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol* 168(4): 1919-1925.
- Rittirsch D, Flierl MA, y Ward PA. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8(10): 776-787.
- 45 Strieter RM, Kasahara K, Allen RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Becker FS, Chensue SW, y Kunkel SL. 1992. Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8. *Am J Pathol* 141(2): 397-407.
- Ward PA. 2009. Functions of C5a receptors. *J Mol Med* 87(4): 375-378.
- 50 Almagro JC y Fransson J. 2008. Humanization of antibodies. *Frontiers in Bioscience* 13: 1619-1633.
- Chang H, Qin W, Li Y, Zhang J, Lin Z, Lv M, Sun Y, Feng J, y Shen B. 2007. A novel human scFv fragment against TNF- α from de novo design method. *Molecular Immunology* 44: 3789-3796.
- 55 Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, Woods RM, Widjaja L, Yu J, y Wu H. 2005. Antibody humanization by framework shuffling. *Methods* 36: 43-60.
- 60 Damschroder MM, Widjaja L, Gill PS, Krasnoperov V, Jiang W, Dall'Acqua WF, y Wu H. 2007. Framework shuffling of antibodies to reduce immunogenicity and manipulate functional and biophysical properties. *Molecular Immunology* 44: 3049-3060.
- Heap CJ, Wang Y, Pinheiro TJT, Reading SA, Jennings KR, y Dimmock NJ. 2005. Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody. *J. Gen. Virol.* 86: 1791-1800.
- 65 Qin W, Feng J, Li Y, Lin Z, y Shen B. 2007. A novel domain antibody rationally designed against TNF- α using variable region of human cadena pesada as scaffolds to display antagonistic peptides. *Molecular Immunology* 44: 2355-2361.

Qiu X-Q, Wang H, Cai B, Wang L-L, y Yue S-T. 2007. Small antibody mimetics comprising two complementary determining regions and a framework region for tumor targeting. Nature biotechnology 25(8): 921-929.

- 5 Información del texto sin listado de secuencias
- 10 SEQ ID NO: 6 INab308 CDR3 cadena pesada
 SEQ ID NO: 7 INab708 CDR3 cadena pesada
 SEQ ID NO: 8 INab308 CDR3 cadena ligera
 SEQ ID NO: 9 INab708 CDR3 cadena ligera
 SEQ ID NO: 10 INab308 CDR2 cadena pesada
 SEQ ID NO: 11 INab708 CDR2 cadena pesada
 SEQ ID NO: 12 INab308 CDR2 cadena ligera
 SEQ ID NO: 13 INab708 CDR2 cadena ligera
 15 SEQ ID NO: 14 INab308 CDR1 cadena pesada
 SEQ ID NO: 15 INab708 CDR1 cadena pesada
 SEQ ID NO: 16 INab308 CDR1 cadena ligera
 SEQ ID NO: 17 INab708 CDR1 cadena ligera
 20 SEQ ID NO: 18 Secuencia de consenso de C5a en la región de los aminoácidos 30-38
 SEQ ID NO: 19 Secuencia de consenso de C5a en la región de los aminoácidos 66-72
 SEQ ID NO: 20 Secuencia de consenso de C5a en la región de los aminoácidos 31-37
 SEQ ID NO: 21 Secuencia de consenso de C5 en la región de los aminoácidos 67-71
 SEQ ID NO: 51 INab308 FR1 cadena pesada
 SEQ ID NO: 52 INab308 FR2 cadena pesada
 25 SEQ ID NO: 53 INab308 FR3 cadena pesada
 SEQ ID NO: 54 INab308 FR4 cadena pesada
 SEQ ID NO: 55 INab308 FR1 cadena ligera
 SEQ ID NO: 56 INab308 FR2 cadena ligera
 SEQ ID NO: 57 INab308 FR3 cadena ligera
 30 SEQ ID NO: 58 INab308 FR4 cadena ligera
 SEQ ID NO: 59 INab708 FR1 cadena pesada
 SEQ ID NO: 60 INab708 FR2 cadena pesada
 SEQ ID NO: 61 INab708 FR3 cadena pesada
 SEQ ID NO: 62 INab708 FR4 cadena pesada
 35 SEQ ID NO: 63 INab708 FR1 cadena ligera
 SEQ ID NO: 64 INab708 FR2 cadena ligera
 SEQ ID NO: 65 INab708 FR3 cadena ligera
 SEQ ID NO: 66 INab708 FR4 cadena ligera
 40 SEQ ID NO: 69 Enlazador peptídico
- Listado de secuencias
- <110> InflaRx GmbH
- 45 <120> Unidades estructurales de unión anti-C5a con actividad bloqueadora alta
- <130> 680-2 PCT
- <160> 69
- 50 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 74
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 613 352 T3

Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10
Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30
Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45
Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60
Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
65 70

5 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 2

Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
1 5

15 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

20 Ser His Lys Asp Met Gln Leu
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 4

30 Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 5

40 His Lys Asp Met Gln
1 5

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> INab308 CDR3 cadena pesada

<400> 6

Cys Ala Arg Gly Asn Asp Gly Tyr Tyr Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> INab708 CDR3 cadena pesada

<400> 7

Cys Thr Arg Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Ser Ser Tyr Phe Ala Tyr
1 5 10 15

15 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> INab708 CDR3 cadena ligera

<400> 8

Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5 10

25 <210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> INab708 CDR3 cadena ligera

<400> 9

35 Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Leu Thr
1 5 10

40 <210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> INab308 CDR2 cadena pesada

<400> 10

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Ser Arg Leu Asp Gln
1 5 10

50 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> INab708 CDR2 cadena pesada

<400> 11

60

	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu
	1				5					10		
5	<210> 12 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
10	<220> <223> INab308 CDR2 cadena ligera <400> 12											
					Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	
					1				5			
15	<210> 13 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
20	<220> <223> INab708 CDR2 cadena ligera <400> 13											
					Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	
					1				5			
30	<210> 14 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
35	<220> <223> INab308 CDR1 cadena pesada <400> 14											
	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Thr	Phe	Trp
	1				5					10		
40	<210> 15 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
45	<220> <223> INab708 CDR1 cadena pesada <400> 15											
	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Asn	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Trp
	1				5					10		
50	<210> 16 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia artificial											
55	<220> <223> INab308 CDR1 cadena ligera <400> 16											
60												

		Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Lys
		1				5					10					15	

5 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> INab708 CDR1 cadena ligera
 <400> 17

		Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn
		1				5					10					15	

15 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de consenso de c5a en la región de los aminoácidos 30-38

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> N, H, D, F, K, Y, o T

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> D, L, Y, o H

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Q, E, o K

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> A, V, o L
 <400> 18

						Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln	Arg	Ala
						1				5				

45 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de consenso de C5a en la región de los aminoácidos 66-72

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (1)
 <223> S, H, P, o N

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)

<223> H o N
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (4)..(4)
 <223> D, N, H, P, o G
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> M, L, I, o V
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Q, L, o I
 <400> 19
 20 Ser His Lys Asp Met Gln Leu
 1 5
 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de consenso de C5a en la región de los aminoácidos 31-37
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (1)
 <223> D, L, Y, o H
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> Q, E, o K
 40 <400> 20
 Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
 1 5
 45 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Secuencia de consenso de C5 en la región de los aminoácidos 67-71
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (1)
 55 <223> H o N
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 60 <223> D, N, H, P, o G
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)

ES 2 613 352 T3

<223> M, L, I, o V
 <220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (5)..(5)
 <223> Q, L, o I
 <400> 21
 10 His Lys Asp Met Gln
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Macaca mulatta
 <400> 22
 20 His Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
 1 5
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Macaca mulatta
 <400> 23
 30 Ser His Lys Asp Leu Gln Leu
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 35 <400> 24
 40 Asp Asp Glu Thr Cys Glu Glu Arg Ala
 1 5
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa
 45 <400> 25
 50 Ser His Lys Asn Ile Gln Leu
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Equus caballus
 <400> 26
 55 Asp Leu Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
 1 5
 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 613 352 T3

<213> Equus caballus	
<400> 27	
5	Ser His Lys His Ile Gln Leu 1 5
<210> 28	
<211> 9	
<212> PRT	
10	<213> Bos taurus
<400> 28	
15	Asp Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala 1 5
<210> 29	
<211> 7	
<212> PRT	
20	<213> Bos taurus
<400> 29	
25	His His Lys Asn Met Gln Leu 1 5
<210> 30	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
30	<400> 30
35	Phe Tyr Glu Thr Cys Glu Glu Arg Val 1 5
<210> 31	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 31	
40	Pro His Lys Pro Val Gln Leu 1 5
<210> 32	
<211> 9	
<212> PRT	
45	<213> Rattus norvegicus
<400> 32	
50	Lys Tyr Glu Thr Cys Glu Gln Arg Val 1 5
<210> 33	
<211> 7	
<212> PRT	
55	<213> Rattus norvegicus
<400> 33	

ES 2 613 352 T3

His His Lys Gly Met Leu Leu
1 5

5 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Canis lupus

10 <400> 34

Tyr Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
1 5

15 <210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Canis lupus

<400> 35

20 Ser Asn Lys Pro Leu Gln Leu
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Monodelphis domestica

<400> 36

Thr His Glu Thr Cys Glu Lys Arg Leu
1 5

30 <210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Monodelphis domestica

35 <400> 37

Asn His Lys Pro Val Ile Leu
1 5

40 <210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Sus scrofa

45 <400> 38

Asp Glu Thr Cys Glu Glu Arg
1 5

50 <210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Equus caballus

<400> 39

55 Leu Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5

<210> 40

ES 2 613 352 T3

	<211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus	
5	<400> 40	
		Tyr Glu Thr Cys Glu Glu Arg 1 5
10	<210> 41 <211> 7 <212> PRT <213> Rattus norvegicus	
15	<400> 41	
		Tyr Glu Thr Cys Glu Gln Arg 1 5
20	<210> 42 <211> 7 <212> PRT <213> Monodelphis domestica	
	<400> 42	
25		His Glu Thr Cys Glu Lys Arg 1 5
30	<210> 43 <211> 5 <212> PRT <213> Macaca mulatta	
	<400> 43	
35		His Lys Asp Leu Gln 1 5
40	<210> 44 <211> 5 <212> PRT <213> Sus scrofa	
	<400> 44	
45		His Lys Asn Ile Gln 1 5
50	<210> 45 <211> 5 <212> PRT <213> Equus caballus	
	<400> 45	
55		His Lys His Ile Gln 1 5
	<210> 46 <211> 5 <212> PRT <213> Bos taurus	
	<400> 46	

ES 2 613 352 T3

His Lys Asn Met Gln
1 5

5
<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 47

His Lys Pro Val Gln
1 5

10

15
<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48

His Lys Gly Met Leu
1 5

20

25
<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Canis lupus

<400> 49

Asn Lys Pro Leu Gln
1 5

30

35
<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Monodelphis domestica

<400> 50

His Lys Pro Val Ile
1 5

40
<210> 51
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> INab308 FR1 cadena pesada

<400> 51

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

50
Ser Val Lys Ile Ser
20

55
<210> 52
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 613 352 T3

<220>
 <223> INab308 FR2 cadena pesada
 <400> 52
 5 Trp val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> INab308 FR3 cadena pesada
 15
 <400> 53
 Arg Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 1 5 10 15
 val Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala val Tyr
 20 25 30
 Tyr
 20
 <210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> INab308 FR4 cadena pesada
 <400> 54
 30 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> INab308 FR1 cadena ligera
 40
 <400> 55
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser
 20
 45
 <210> 56
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>

<223> INab308 FR2 cadena ligera
 <400> 56

5 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 1 5 10

<210> 57
 <211> 33
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> INab308 FR3 cadena ligera

15 <400> 57

Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 1 5 10 15

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> INab308 FR4 cadena ligera

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

30 <210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> INab708 FR1 cadena pesada

<400> 59

40 Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Val Lys Ile Ser
 20

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> INab708 FR2 cadena pesada

50 <400> 60

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
1 5 10 15

<210> 61
<211> 33
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> INab708 FR3 cadena pesada
<400> 61

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr
1 5 10 15

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr

15
20
25
30
35

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> INab708 FR4 cadena pesada

<400> 62

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 63
30 <211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> INab708 FR1 cadena ligera
<400> 63

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser
20

40
45

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> INab708 FR2 cadena ligera
<400> 64

ES 2 613 352 T3

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
1 5 10

<210> 65

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> INab708 FR3 cadena ligera

<400> 65

Gly Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
1 5 10 15

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Val Ala Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> INab708 FR4 cadena ligera

<400> 66

Phe Gly Ala Gly Thr Leu Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Ile Ser His Lys Asp Met
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador peptídico

ES 2 613 352 T3

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

Reivindicaciones

1. Una unidad estructural de unión que se une a un epítipo conformacional formado por las secuencias de aminoácidos NDETCEQRA (SEQ ID NO: 2) y SHKDMQL (SEQ ID NO: 3) de C5a, en donde la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 y a al menos un aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3; en donde dicha unidad estructural de unión tiene una constante de unión a C5a con un valor de K_d de 10 nM o menos y exhibe al menos 80% de actividad de bloqueo para un efecto biológico inducido por C5a; y en donde dicha estructural de unión se selecciona del grupo que consiste en:
 - (a) anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión al antígeno; y
 - (b) proteínas similares al anticuerpo, en donde dichas proteínas similares al anticuerpo se seleccionan del grupo que consiste en aficuerpos, anticalinas, y proteínas diseñadas de repeticiones de anquirina.
2. La unidad estructural de unión de la reivindicación 1, en donde la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con DETCEQR (SEQ ID NO: 4).
3. La unidad estructural de unión de la reivindicación 1 o 2, en donde la unidad estructural de unión se une a al menos un aminoácido de una secuencia de aminoácido de acuerdo con HKDMQ (SEQ ID NO: 5), preferiblemente KDM.
4. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha unidad estructural de unión exhibe una o más de los siguientes propiedades:
 - dicha unidad estructural de unión no inhibe la actividad de CH50 en plasma humano;
 - dicho unidad estructural de unión es capaz de reducir la producción de IL-8 inducida por *E. coli* en sangre entera humana.
5. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno, siendo dicho anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.
6. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la unidad estructural de unión es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, siendo fragmento seleccionado del grupo que consiste de fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, Fragmentos Fd, fragmentos Fv, Fvs enlazados a disulfuro (dsFv), anticuerpos de dominio único y anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv).
7. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende:
 - (i) una secuencia de CDR3 de cadena pesada como la expuesta en la SEQ ID NO: 6; o
 - (ii) una secuencia de CDR3 de cadena pesada como la expuesta en la SEQ ID NO: 7;
 en donde la secuencia de CDR3 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidas y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos, que comprende además al menos una de las siguientes secuencias:
 - (i) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10;
 - (ii) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11;
 - (iii) una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12;
 - (iv) una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 13;
 - (v) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14;
 - (vi) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15;
 - (vii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16; o
 - (viii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17;
 en donde la secuencia de CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2, o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácido, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además:

- (i) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como la expuesta en SEQ ID NO: 8; o
- (ii) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como la expuesta en la SEQ ID NO: 9;

en donde la secuencia CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.

9. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende:

- (i) una secuencia de CDR3 de cadena ligera como la expuesta en SEQ ID NO: 8; o
- (ii) una secuencia CDR3 de cadena ligera como la expuesta en la SEQ ID NO: 9;

en donde la secuencia CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.

10. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además al menos una de las siguientes secuencias:

- (i) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10;
- (ii) una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11;
- (iii) una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12;
- (iv) una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 13;
- (v) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14;
- (vi) una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15;
- (vii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16; o
- (viii) una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17;

en donde la secuencia CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 amino supresiones ácidas y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2, o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos; en donde la secuencia de CDR1 de la cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.

11. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende un conjunto de secuencias de CDR3 de cadena pesada, CDR2 de cadena pesada y CDR1 de cadena pesada seleccionadas de uno de los siguientes conjuntos:

- (i) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14;
- (ii) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 15;
- (iii) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14;
- (iv) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15;
- (v) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14;
- (vi) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 15;
- (vii) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14; o
- (viii) una secuencia de CDR3 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, una secuencia de CDR2 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, y una secuencia CDR1 de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 15;

en donde cada secuencia de CDR3 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia CDR2 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambio de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; y en donde cada secuencia CDR1 de cadena pesada comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.

12. La unidad estructural de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha unidad estructural de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprende un conjunto de secuencias de CDR3 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera y CDR1 de cadena ligera seleccionadas de uno de los siguientes conjuntos:

- (i) una secuencia de CDR3 de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 12, y una secuencia CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16;
- (ii) una secuencia CDR3 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17;
- (iii) una secuencia de CDR3 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, y una secuencia CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 16; o
- (iv) una secuencia de CDR3 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, una secuencia de CDR2 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 17;

en donde cada secuencia CDR3 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; en donde cada secuencia de CDR2 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos; y en donde cada secuencia de CDR1 de cadena ligera comprende opcionalmente 1, 2 o 3 intercambios de aminoácidos, 1, 2 o 3 supresiones de aminoácidos y/o 1, 2, o 3 adiciones de aminoácidos.

13. Composición farmacéutica que comprende

- (a) la unidad estructural de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o
- (b) el anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12

y que comprende además uno o más portadores, diluyentes, excipientes, rellenos, aglutinantes, lubricantes, deslizantes, desintegrantes, adsorbentes y/o conservantes farmacéuticamente aceptables.

14. Uso de

- (a) una unidad estructural de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o
- (b) un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12

para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades que involucran inflamación aguda tales como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave, choque séptico, lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión tales como cardiopatía isquémica, lesión pulmonar aguda, neumonía, rechazo agudo y crónico de injerto en pacientes trasplantados, reacciones de injerto contra huésped, así como enfermedades que involucran tipos crónicos de inflamación tales como enfermedades glomerulares renales tales como glomerulonefritis y otras entidades de insuficiencia renal, artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes similares tales como la enfermedad de Bechterew, enfermedades tipo lupus, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, crecimiento tumoral o cáncer de órganos sólidos.

Fig. 1

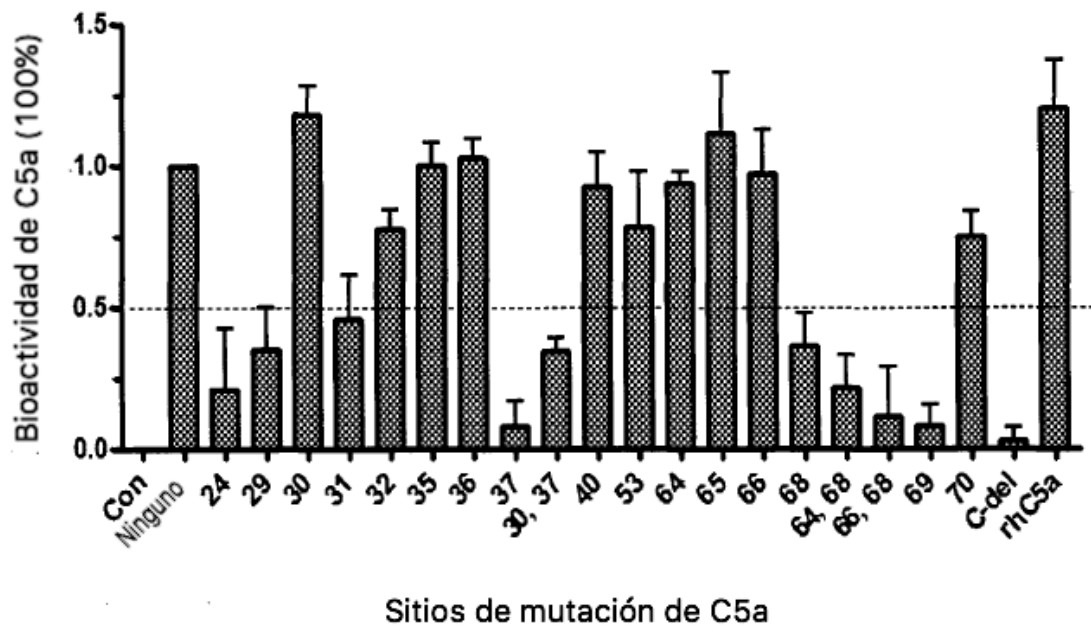


Fig. 2

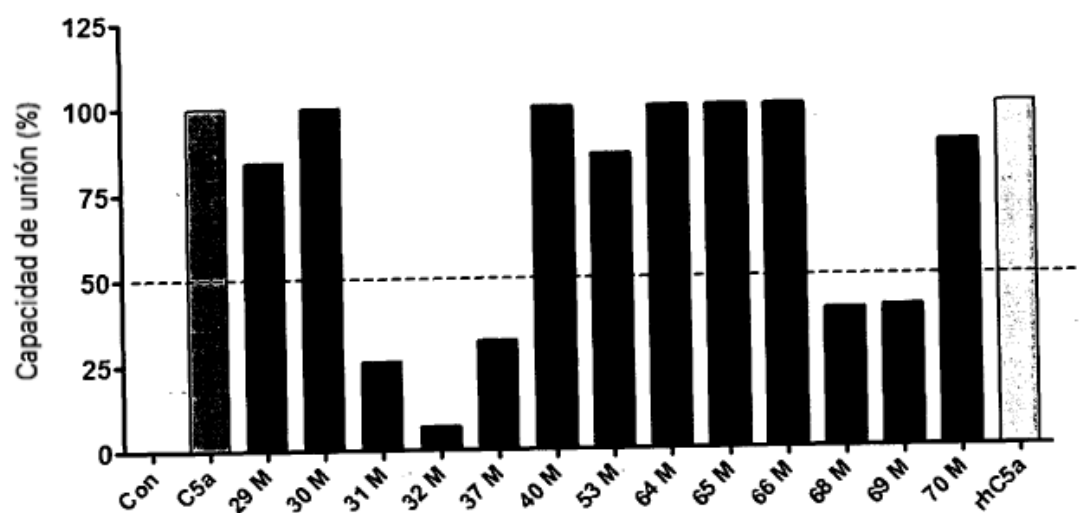


Fig. 3

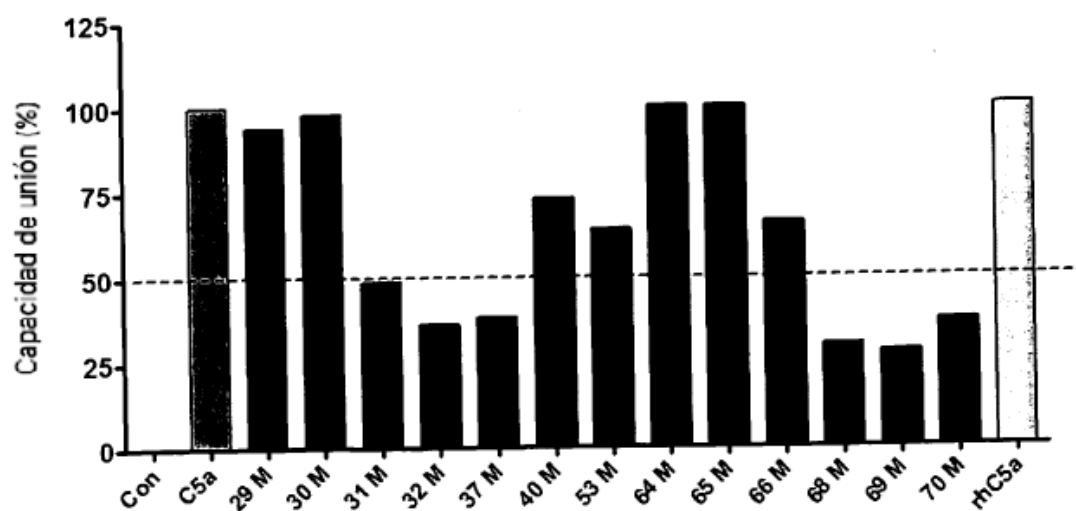


Fig. 4

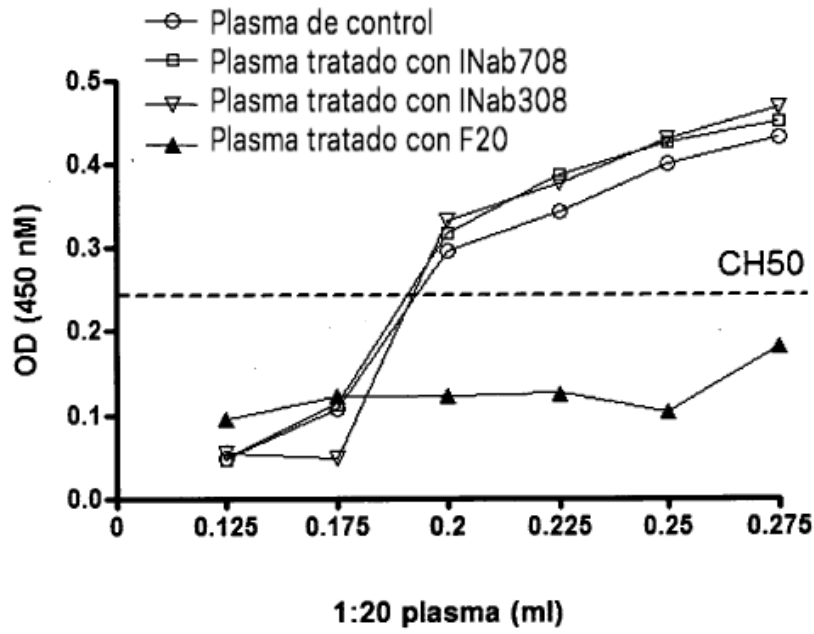


Fig. 6

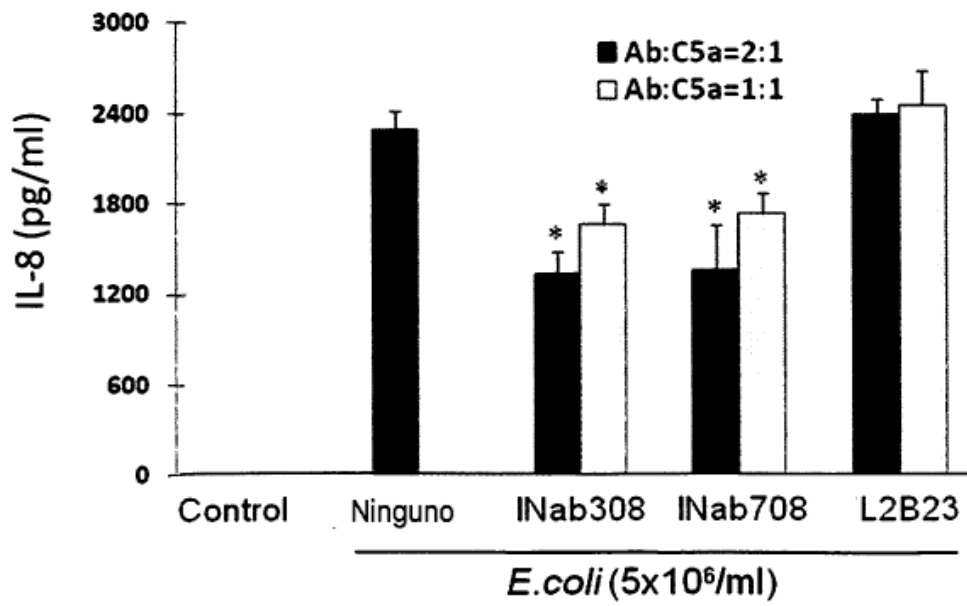


Fig. 5

