

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 344**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2004** E 11172040 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** EP 2374819

54 Título: **Anticuerpos contra la MASP-2**

30 Prioridad:

**12.05.2003 DK 200300716**

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

**08.08.2017**

73 Titular/es:

**HELION BIOTECH APS (100.0%)**

**Ole Maaløes Vej 3**

**2200 Copenhagen N, DK**

72 Inventor/es:

**LARSEN, FLEMMING y**

**WAHLERS, ULLA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 629 344 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la MASP-2

5 **Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

15 El sistema del complemento comprende un conjunto complejo de enzimas y proteínas no enzimáticas de importancia para la función del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo<sup>1</sup>. Hasta hace poco se conocían dos modos de activación, la vía clásica iniciada por complejos anticuerpo-antígeno y la vía alternativa iniciada por determinadas estructuras sobre superficies microbianas. Se ha descrito una tercera vía nueva e independiente de anticuerpos para la activación del complemento<sup>2</sup>. Esta vía se inicia cuando una lectina de unión a manano (MBL, del inglés *mannan-binding lectin*, descrita primero como proteína de unión a manano<sup>3</sup>, MBP, véase Ezekowitz, Patente de los EE.UU. 5.270.199) se une a hidratos de carbono y se conoce como la vía MBLectina.

La MBL está relacionada estructuralmente con el subcomponente C1q del componente C1 del complemento, y parece que la MBL activa el sistema del complemento a través una serina proteasa asociada denominada MASP<sup>4</sup> o p100<sup>5</sup>, que es similar a los componentes C1 r y C1 s de la vía clásica. La nueva vía de activación del complemento se denomina vía MBLectina. De acuerdo con el mecanismo postulado para esta vía, la MBL se une a estructuras de hidrato de carbono específicas que se encuentran en la superficie de una gama de microorganismos que incluyen bacterias, levaduras, protozoos parasitarios y virus<sup>5</sup>, y su actividad antimicrobiana es resultado de la activación de los componentes de la vía del complemento líticos terminales<sup>7</sup> o de la promoción de la fagocitosis<sup>8</sup>.

Las MASP (serina proteasas asociadas a MBL) son serina proteasas similares en estructura al C1 r y el C1 s de la vía del complemento. La MASP-1 tiene una estructura de lazo de histidina del tipo que se encuentra en la tripsina y en las serina proteasas similares a la tripsina. Se ha descubierto que la MASP-1 está implicada en la activación del complemento por MBL. Se ha notificado que un clon de ADNc que codifica la MASP-1 codifica un supuesto péptido líder de 19 aminoácidos seguidos de 680 restos de aminoácidos que se prevé que forman el péptido maduro.

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

Los anticuerpos contra la MASP-2 se han descrito anteriormente en la técnica.

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

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

**Sumario de la invención**

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

La presente invención desvela que los anticuerpos contra la parte C-terminal de la MASP-2 son capaces de inhibir la actividad de la MASP-2 más eficazmente que los anticuerpos contra la parte N-terminal de la MASP-2. La solicitud además desvela epítomos de la MASP-2, en los que los anticuerpos que reconocen dichos epítomos son particularmente útiles para la inhibición de la actividad de la MASP-2. Se describen epítomos preferidos en la presente memoria a continuación en el presente documento.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o a un equivalente funcional del mismo que reconoce específicamente y se une a al menos parte de un epítomo reconocido por uno o más anticuerpos de referencia

seleccionados entre el grupo que consiste en:

- i el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de deposición 03050904;
- ii el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM029;
- iii el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM035;
- iv el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM046; y
- v el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM048.

En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconozcan específicamente y se unan a un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2 o a un homólogo funcional de la misma.

Es además un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos aislados que comprendan un fragmento C-terminal de la MASP-2, siendo útil dicho polipéptido para generar anticuerpos contra epítipos del extremo C de la MASP-2. En particular, los polipéptidos aislados de la parte C-terminal de la MASP-2 o un homólogo funcional de la misma, pueden ser polipéptidos que comprenden o que consisten en:

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

el dominio CCP1 y el de CCP2.

Es además un objetivo de la presente solicitud proporcionar métodos de producción de un anticuerpo que inhiba la actividad de la MASP-2, mediante la inmunización de un animal, preferentemente un mamífero, con polipéptidos aislados que comprenden un fragmento C-terminal de la MASP-2, siendo útil dicho polipéptido para generar anticuerpos contra epítipos del extremo C de la MASP-2. En particular, los polipéptidos aislados de la parte C-terminal de la MASP-2 o de un homólogo funcional de la misma, pueden ser polipéptidos que comprenden o que consisten en:

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

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar métodos de producción de un anticuerpo que reconozca específicamente y se una a un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2 o un análogo funcional de la misma, que comprende la etapa de administrar a un animal la parte C-terminal de la MASP-2 o un fragmento de la misma o un análogo funcional de la misma. También se desvelan por la invención anticuerpos producidos de acuerdo con el método.

Es otro objetivo adicional de la invención proporcionar métodos de inhibición de la actividad de la MASP-2 que comprenden las etapas de

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

La inhibición de la MASP-2 conducirá a la inhibición de la activación del complemento, preferentemente a la inhibición de la vía MBlectina. En consecuencia, pueden usarse anticuerpos que inhiben la actividad de la MASP-2 para inhibir la activación de la vía MBlectina y, en consecuencia, dichos anticuerpos pueden ser útiles para el tratamiento de afecciones clínicas que se caractericen por una activación impropia del complemento, preferentemente una activación impropia de la vía MBlectina.

Por tanto, la invención también se refiere a métodos de inhibición de la vía MBlectina, implicando preferentemente dichos métodos el uso de anticuerpos contra la MASP-2, capaces de inhibir la actividad de la MASP-2.

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

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

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

**Descripción de los dibujos**

- 10 La Figura 1 describe una representación esquemática de MASP-2 que indica los dominios individuales
- La Figura 2 representa un alineamiento de las secuencias humanas de MASP-1, MASP-2, C1r y C1s que indica la presencia de los dominios individuales en MASP-2. Los aminoácidos conservados en las cuatro proteínas se indican además con asteriscos.
- 15 La Figura 3 representa la inhibición de la deposición de C4 en suero completo por un anticuerpo contra MASP-2.
- La Figura 4 representa la inhibición de la deposición de C4 por diferentes concentraciones de anticuerpo contra MASP-2.
- 20 La Figura 5 muestra un ensayo de deposición de C4. La figura ilustra la inhibición de la deposición de C4 en suero humano usando diferentes anticuerpos anti-MASP-2 purificados.
- 25 La Figura 6 muestra un montaje de transferencias Western contra la MASP-2 en suero humano usando 4 anticuerpos diferentes. Se cargó suero humano en cada calle. La figura se ha montado a partir de cuatro transferencias Western usando los anticuerpos mostrados en las calles superiores para la detección.
- 30 La Figura 7 muestra los resultados de un ELISA competitivo para la determinación de epítopos solapados.
- La Figura 8 ilustra la secuencia de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-6cons).
- 35 La Figura 9 ilustra la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-3consRev).
- La Figura 10 muestra un alineamiento entre secuencias de la cadena pesada del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-, 2, 3, 4, 5, 8) junto con secuencias homólogas identificadas mediante búsquedas BLAST.
- 40 La Figura 11 muestra el alineamiento entre secuencias de la cadena ligera del anticuerpo NimoAb101 (DWE16140-6, 7, 9, 10) junto con secuencias homólogas identificadas mediante búsquedas BLAST.

**Listado de secuencias**

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

45 **Definiciones**

La expresión "parte C-terminal de la MASP-2" se refiere al extremo C de la MASP-2 que comprende los dominios EFG, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa, donde la parte C-terminal de la MASP-2 no incluye el dominio CUB1.

- 50 El término "epítipo" se refiere a un sitio específico sobre un compuesto, es decir una proteína a la que se une específicamente un determinado anticuerpo. Un epítipo puede ser lineal, es decir, un péptido, o un péptido puede ser una estructura tridimensional.

## Descripción detallada de la invención

### Anticuerpos

5 Un aspecto de la presente divulgación es proporcionar anticuerpos o equivalentes funcionales de los mismos que reconozcan específicamente y se unan a un epítipo de la parte C-terminal de la MASP-2 o un homólogo funcional de la misma. El epítipo puede ser cualquiera de los epítipos mencionados anteriormente en el presente documento.

10 El anticuerpo o equivalente funcional del mismo puede ser cualquier anticuerpo conocido en la técnica, por ejemplo un anticuerpo policlonal o monoclonal derivado de un mamífero o un anticuerpo sintético, tal como un anticuerpo de monocatenario o híbridos que comprendan fragmentos de anticuerpo. Además, el anticuerpo puede ser mezclas de anticuerpos monoclonales o de anticuerpos policlonales artificiales. Además, los equivalentes funcionales de anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, en particular fragmentos de unión a epítipos. Además, los anticuerpos o el equivalente funcional de los mismos pueden ser miméticos de molécula pequeña, que imiten a un anticuerpo. Los anticuerpos de origen natural son moléculas de inmunoglobulina que consisten en cadenas pesadas y ligeras. En realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 Los anticuerpos monoclonales (Mab) son anticuerpos, en los que todas las moléculas de anticuerpo son similares y por tanto reconocen el mismo epítipo. Los anticuerpos monoclonales en general son producidos por una estirpe celular de hibridoma. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales y células de hibridoma que sintetizan anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los hibridomas que producen anticuerpos pueden prepararse por fusión de un linfocito B productor de anticuerpos con una estirpe celular de linfocitos B inmortalizada. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, como se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, por Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Dichos anticuerpos monoclonales pueden derivar de cualquier especie de mamífero adecuada, sin embargo con frecuencia los anticuerpos monoclonales serán anticuerpos de roedor, por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos o de rata. Se prefiere que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención sean anticuerpos monoclonales o que deriven de anticuerpos monoclonales.

20 Los anticuerpos policlonales son una mezcla de moléculas de anticuerpo que reconocen un antígeno específico dado, por tanto los anticuerpos policlonales pueden reconocer diferentes epítipos dentro de dicho antígeno. En general, los anticuerpos policlonales se purifican a partir de suero de un mamífero, que previamente ha sido inmunizado con el antígeno. Los anticuerpos policlonales pueden, por ejemplo, prepararse mediante cualquiera de los métodos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual*, por Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los anticuerpos policlonales pueden derivar de cualquier especie de mamífero adecuada, por ejemplo de ratones, ratas, conejos, burros, cabras, ovejas, vacas o camellos. El anticuerpo preferentemente no deriva de una especie no mamífera, es decir, el anticuerpo por ejemplo preferentemente no es un anticuerpo contra pollo. El anticuerpo también puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal artificial como por ejemplo el descrito en los documentos US 5.789.208 o US 6.335.163.

25 En una realización de la invención el anticuerpo es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos humanos pueden fabricarse contra moléculas diana humanas, por ejemplo mediante ingeniería de proteínas, por selección a partir de bibliotecas sintéticas o por inmunización de ratones transgénicos que portan genes de anticuerpo.

30 Como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos humanizados en general son anticuerpos quiméricos que comprenden regiones derivadas de un anticuerpo humano y regiones derivadas de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor. La humanización (también denominada Reformado o injerto de CDR) es una técnica bien establecida para reducir la inmunogenia de anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de fuentes xenógenas (habitualmente roedores) y para mejorar su activación del sistema inmunitario humano, regiones marco conservadas sobre las que injertar las CDR de roedor. La expresión "molécula de anticuerpo humanizado" (HAM, del inglés *humanised antibody molecule*) se usa en el presente documento para describir una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana, mientras que algunas o todas las partes restantes derivadas de inmunoglobulina de la molécula derivan de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender: un dominio variable completo procedente de una inmunoglobulina no humana fusionado sobre uno o más dominios constantes humanos; o una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones marco conservadas humanas apropiadas en el dominio variable. Un método para humanizar MAb relativo a la producción de anticuerpos quiméricos en el que un sitio de unión a antígeno que comprende los dominios variables completos de un anticuerpo se fusiona con dominios constantes derivados de un segundo anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humano. Los métodos para realizar dichos procedimientos de quimerización se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A-0 120 694 (Celltech Limited), EP-A-0 125 023 (Genetech Inc.), EP-A-0 171 496 (Res. Dev. Corp. Japón), EP-A-0173494 (Universidad de Stanford) y EP-A-0 194 276 (Celltech Limited). Una forma más compleja de humanización de un anticuerpo implica el rediseño del dominio región variable de manera que los aminoácidos que constituyen el sitio de unión de anticuerpo no humano se integran en la región marco conservada de una región variable de anticuerpo humano (Jones et al., 1986).

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

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

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

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

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

(2) Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo y puede obtenerse tratando el anticuerpo entero con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y a una porción de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas procedentes de la región bisagra.

(3) (Fab')<sub>2</sub> es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse tratando anticuerpo entero con la enzima pepsina sin la posterior reducción. F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' que están unidos por dos enlaces disulfuro.

(4) Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación íntima no covalente (dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

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

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

En otra realización de la presente divulgación el equivalente funcional de un anticuerpo es un mimético de molécula pequeña, que imita a un anticuerpo.

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

Además, son anticuerpos preferidos los anticuerpos, o los equivalentes funcionales de los mismos, capaces de inhibir la deposición de C2 de complejos MBL-MASP-2. Son anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación aún más preferidos los anticuerpos, o sus equivalentes funcionales, capaces de inhibir la deposición de C2 en suero completo. Son anticuerpos aún más preferidos, o los equivalentes funcionales de los mismos, los capaces de inhibir la deposición de C2 en suero completo de individuos con actividad de deposición de C2. Se describen ensayos útiles para determinar la deposición de C2 a continuación en el presente documento.

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

En una realización muy preferida de la invención, el anticuerpo se selecciona entre el grupo de anticuerpos monoclonales producidos por las estirpes celulares de hibridoma depositadas con el número de registro 03050904. Además, los equivalentes funcionales pueden ser fragmentos, preferentemente fragmentos de unión de dichos anticuerpos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

o un equivalente funcional de las mismas. Este anticuerpo además, preferentemente es capaz de inhibir la actividad de la MASP-2 y/o es capaz de reconocer específicamente un epítipo de la MASP-2 tal como se describe a continuación en el presente documento.

### Epítopos y péptidos de la MASP-2

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

Los anticuerpos y los equivalentes funcionales de los mismos de acuerdo con la presente invención reconocen específicamente un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2. "Reconocen específicamente" significa que el anticuerpo se une a dicho epítipo con una afinidad significativamente mayor que cualquier otra molécula o parte de la misma. Preferentemente, el anticuerpo solo se une a dicho epítipo como se detecta mediante Transferencia Western o ELISA. Para asegurar que el anticuerpo reconozca específicamente un epítipo dentro de un fragmento dado de la MASP-2, se puede usar dicho fragmento como antígeno durante la generación de dicho anticuerpo. Se prefiere en la presente invención que el antígeno de la MASP-2 usado para la inmunización sea más grande de 18 aminoácidos, por ejemplo que tenga una longitud de al menos 20, tal como al menos 25, por ejemplo al menos 30

aminoácidos. A modo de ejemplo, si el anticuerpo debiera reconocer un epítipo dentro los dominios CCP1, CCP2 y serina proteasa, se podría usar un péptido que consista en los dominios CCP1, CCP2 y serina proteasa como antígeno durante la generación de dicho anticuerpo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de la MASP-2 que comprende o que preferentemente consiste en los aminoácidos 363 a 385, tal como del 370 al 390, por ejemplo del 380 al 400, tal como del 390 al 410, por ejemplo del 400 al 420, tal como del 410 al 430, por ejemplo del 420 al 440, tal como del 430 al 450, por ejemplo del 440 al 460, tal como del 450 al 470, por ejemplo del 460 al 480, tal como del 470 al 490, por ejemplo del 480 al 500, tal como del 490 al 510, por ejemplo del 500 al 520, tal como del 510 al 530, por ejemplo del 520 al 540, tal como del 530 al 550, por ejemplo del 540 al 10 560, tal como del 550 al 570, por ejemplo del 560 al 580, tal como del 570 al 590, por ejemplo del 580 al 600, tal como del 590 al 610, por ejemplo del 600 al 620, tal como del 610 al 630, por ejemplo del 620 al 640, tal como del 630 al 650, por ejemplo del 640 al 660, tal como del 650 al 670, por ejemplo del 660 al 686 de la SEQ ID 1, en la que dicho fragmento como mucho comprende 100, preferentemente como mucho 80, más preferentemente como mucho 60, incluso más preferentemente como mucho 40 aminoácidos.

15 En otra realización preferida, el anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de la MASP-2, que comprende o consiste preferentemente en los aminoácidos 400 a 420, tal como del 410 al 430, por ejemplo del 420 al 440, tal como del 430 al 450, por ejemplo del 440 al 460, tal como del 450 al 470, por ejemplo del 460 al 480, tal como del 470 al 490, por ejemplo del 480 al 500, tal como del 490 al 510, por ejemplo del 500 al 20 520, tal como del 510 al 530, por ejemplo del 520 al 540, tal como del 530 al 550 de la SEQ ID 1, en la que dicho fragmento como mucho comprende 100, preferentemente como mucho 80, más preferentemente como mucho 60, incluso más preferentemente como mucho 40 aminoácidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

- 60 • el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito 03050904;
- la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM029; y
- la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM035.

65 De acuerdo con la presente invención, cuando un anticuerpo dado reconoce al menos parte de un epítipo reconocido por otro anticuerpo dado, se dice que dichos dos anticuerpos reconocen el mismo epítipo o epítopos

solapados.

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

- Proporcionar MASP-2 o un fragmento de la misma que comprende el epítipo reconocido por el anticuerpo de referencia.
- Añadir el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia a dicha MASP-2, en la que el anticuerpo de ensayo o el anticuerpo de referencia están marcados con un marcador detectable. Como alternativa, ambos anticuerpos pueden estar marcados con diferentes marcadores detectables.
- Detectar la presencia del marcador detectable en la MASP-2.
- Detectar con ello si el anticuerpo de ensayo puede desplazar al anticuerpo de referencia.

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

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

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

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

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

En otra realización adicional de la presente solicitud, el polipéptido de la MASP-2 aislado comprende o preferentemente consiste en el dominio CCP2. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender o incluso más preferentemente consistir en los aminoácidos 363 a 431 de la SEQ ID 1 o un equivalente funcional de la misma.

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

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

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

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

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

Los homólogos funcionales de acuerdo con la presente solicitud preferentemente son polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50 por ciento, preferentemente al menos aproximadamente un 60 por ciento, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 por ciento, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 75 por ciento, aún más preferentemente al menos aproximadamente un 80 por ciento, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 85 por ciento, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 90 por ciento, incluso más preferentemente al menos un 95 por ciento de homología, mucho más preferentemente al menos un 98 por ciento de identidad con las secuencias de polipéptidos de la MASP-2 predeterminadas, como se han esbozado anteriormente en el presente documento.

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

Una sustitución de aminoácidos conservadora es una sustitución de un aminoácido dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos por otro aminoácido dentro del mismo grupo, en la que los aminoácidos dentro de grupos predeterminados presentan características similares o sustancialmente similares. Dentro del significado de la expresión "sustitución de aminoácidos conservadora" tal como se aplica en el presente documento, un aminoácido puede estar sustituido por otro que esté dentro de los grupos de aminoácidos que se caracterizan por tener:

i) cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys)

ii) cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)

iii) cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)

iv) cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

v) cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)

vi) cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)

vii) cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)

viii) cadenas laterales de amida (Asn, Gln)

ix) cadenas laterales de hidroxilo (Ser, Thr)

x) cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met), y

xi) aminoácidos que son ácidos monoamino-dicarboxílicos o ácidos monoaminomonocarboxílico-monoamidocarboxílicos (Asp, Glu, Asn, Gln).

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

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

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

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

Los homólogos funcionales puede además ser un polipéptido codificado por un ácido nucleico que sea capaz de hibridarse con la cadena complementaria de una secuencia de ácido nucleico que codifica las secuencias de polipéptido de la MASP-2 predeterminadas, como se han esbozado anteriormente en el presente documento en condiciones estrictas.

Las condiciones estrictas como se usan en el presente documento denotan la estrictez aplicada normalmente a la transferencia Southern y la hibridación tal como se describe, por ejemplo, en Southern E.M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503-517. Para dicho propósito, es habitual incluir las etapas de prehibridación e hibridación. Dichas etapas normalmente se realizan usando soluciones que contienen 6x SSPE, Denhardt al 5 %, SDS al 0,5 %, formamida al 50 %, ADN de testículo de salmón desnaturalizado 100 µg/ml (incubación durante 18 h a 42 °C), seguido de lavados con 2x SSC y SDS al 0,5 % (a temperatura ambiente y a 37 °C), y un lavado con 0,1x SSC y SDS al 0,5 % (incubación a 68 °C durante 30 minutos), como describen Sambrook et al., 1989, en "*Molecular Cloning/A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor).

El epítipo o epítipos reconocidos por un anticuerpo específico pueden determinarse mediante cualquier método convencional, por ejemplo métodos que impliquen el uso de espectrometría de masas. Los ejemplos no limitantes de métodos de cartografiado de epítipos usando espectrometría de masas incluyen:

1. Baerga-Ortiz, A, Hughes, CA, Mandell, JG, Komives, EA: *Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D- exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein. Protein Sci.* 11: 1300-1308, 2002.

2. Hochleitner, EO, Borchers, C, Parker, C, Bienstock, RJ, Tomer, KB: *Characterization of a discontinuous epitope of the human immunodeficiency virus (HIV) core protein p24 by epitope excision and differential chemical modification followed by mass spectrometric peptide mapping analysis.*

3. Hochleitner, EO, Gorny, MK, Zolla-Pazner, S, Tomer, KB: *Mass spectrometric characterization of a discontinuous epitope of the HIV envelope protein HIV-gp120 recognized by the human monoclonal antibody 1331A. J. Immunol.* 164: 4156-4161, 2000.

4. Parker, CE, Tomer, KB: *MALDI/MS-based epitope mapping of antigens bound to immobilized antibodies. Mol. Biotechnol.* 20: 49-62, 2002.

5. Peter, JF, Tomer, KB: *A general strategy for epitope mapping by direct MALDI-TOF mass spectrometry using secondary antibodies and cross-linking. Anal. Chem.* 73: 4012-4019, 2001.

6. Van De, WJ, Deininger, SO, Macht, M, Przybylski, M, Gershwin, ME: *Detection of molecular determinants and epitope mapping using MALDI-TOF mass spectrometry. Clin. Immunol. Immunopathol.* 85: 229-235, 1997.

7. Yu, L, Gaskell, SJ, Brookman, JL: *Epitope mapping of monoclonal antibodies by mass spectrometry: identification of protein antigens in complex biological systems. J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 208-215, 1998.

8. Zhao, Y, Chalt, BT: *Protein epitope mapping by mass spectrometry. Anal. Chem.* 66: 3723-3726, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla con un antígeno administrado incremente o modifique de cualquier otro modo la respuesta inmunitaria frente a dicho antígeno. Los adyuvantes, por ejemplo, pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en  $AlK(SO_4)_2$ ,  $AlNa(SO_4)_2$ ,  $AlNH_4(SO_4)$ , sílice, alúmina,  $Al(OH)_3$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$ , caolín, carbón, hidróxido de aluminio, dipéptidos de muramilo, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-nomuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominada nor-MDP), N-acetilmuramiul-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominada MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween-80®, lipopolisacáridos y sus diversos derivados, que incluyen lípido A, Adyuvante Completo de Freund (FCA), Adyuvantes Incompletos de Freund, Adyuvante Merck 65, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de Mycobacterium tuberculosis, sustancias encontradas en Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis, y miembros del género Brucella, liposomas u otras emulsiones de lípidos, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados de Lípido A, derivados de coleratoxina, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices de péptidos sintéticas o GMDP, Interleucina 1, Interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos para su uso con la invención incluyen el Adyuvante Completo de Freund (FCA) y los Adyuvantes Incompletos de Freund.

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

El antígeno de la MASP-2 puede administrarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, por vía parenteral, oral o tópica. Preferentemente, sin embargo, el antígeno se administra mediante inyección, por ejemplo,

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

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

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

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

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

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

30 El ensayo se puede realizar mediante cualquier método adecuado, por ejemplo métodos que detecten la presencia de anticuerpos capaces de asociarse al antígeno de la MASP-2. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, la transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), transferencia puntual o TRIFMA. Además o como alternativa, dicho medio de cultivo puede someterse a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos de la MASP-2 capaces de inhibir la actividad de la MASP-2. A continuación en el presente documento se describen ensayos adecuados para determinar la actividad de la MASP-2.

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

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

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

50 Un ejemplo no limitante de un método para preparar anticuerpos de acuerdo con la presente invención se describe a continuación en el presente documento en el Ejemplo 1.

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

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

65 En otra realización de la presente invención, los métodos implican el uso de animales, por ejemplo, roedores, tales como ratones modificados genéticamente para producir anticuerpos quiméricos o anticuerpos de otras especies, por ejemplo anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden inmunizar animales transgénicos, tales como ratones transgénicos, que portan genes de anticuerpo procedentes de otras especies, tales como genes de anticuerpos

humanos, con cualquiera de los fragmentos de la MASP-2 mencionados anteriormente.

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

#### **Inhibición de la actividad de la MASP-2**

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

- 1) Proporcionar una composición que comprenda MASP-2;
- 2) Proporcionar un anticuerpo contra MASP-2 de acuerdo con la invención;
- 3) Incubar dicha composición con dicho anticuerpo, inhibiendo de este modo la actividad de la MASP-2.

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

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

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

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

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

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

Se añade un sustrato de la MASP-2 a los complejos MBL/MASP-2. Preferentemente, dicho sustrato es C2 o C4, o una mezcla de ambos. El sustrato puede producirse de forma recombinante o puede ser un sustrato derivado de suero. El sustrato puede haberse purificado antes de su uso o no, pero preferentemente se purifica. Con el fin de controlar la deposición, el sustrato puede marcarse con un marcador detectable, por ejemplo con una enzima, un compuesto radiactivo, un compuesto fluorescente, un colorante, un metal pesado, un compuesto quimioluminiscente u otro similar.

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

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

pueden realizarse en el orden descrito.

Si los complejos MBL/MASP-2, el sustrato y el anticuerpo se mezclan antes de la inmovilización, entonces dicha mezcla puede preincubarse durante un tiempo dado, por ejemplo la preincubación puede estar en el rango de 5 minutos a 2 horas. En general, el MBL/MASP-2, el sustrato y el anticuerpo se premezclan cuando los complejos MBL/MASP-2 están presentes en el suero y no se han purificado previamente a partir de suero.

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

### **Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas**

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

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

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

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

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

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

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

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan en una forma que es inyectable, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; además, las formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en un líquido antes de ser inyectadas también entran dentro del alcance de la presente invención. La

preparación se puede emulsionar o el determinante inmunógeno, así como las colectinas y/u homólogos de colectina de acuerdo con la presente invención, se pueden encapsular en liposomas.

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

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

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

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

### Afecciones clínicas

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

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

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

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

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

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

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

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

**Realizaciones**

La presente solicitud se ejemplifica mediante las siguientes realizaciones.

- 5 1. Un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo que reconocen específicamente y se unen a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2, en el que dicho anticuerpo o equivalente funcional del mismo reconoce específicamente al menos parte de un epítipo reconocido por uno o más anticuerpos de referencia seleccionados entre el grupo que consiste en
  - 10 vi. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito 03050904;
  - vii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM029;
  - viii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM035;
  - 15 ix. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM046; y
  - x. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM048.
2. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal murino.
- 20 4. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que el anticuerpo se ha humanizado.
5. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.
- 25 6. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho equivalente funcional es un fragmento de unión de un anticuerpo.
7. El anticuerpo de acuerdo con la realización 6, en el que dicho fragmento se selecciona entre el grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv.
- 30 8. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho equivalente funcional es un anticuerpo monocatenario.
9. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho equivalente funcional es un mimético de molécula pequeña, que imita un anticuerpo.
- 35 10. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que la parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los dominios CCP2 y serina proteasa.
- 40 11. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que la parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en el dominio serina proteasa.
12. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que la MASP-2 es MASP-2 humana como se identifica por la SEQ ID 1.
- 45 13. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de la MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 363 a 686 de la SEQ ID 1. (= CCP2, serina proteasa)
- 50 14. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de un fragmento de la MASP-2 que comprende o que consiste en los aminoácidos 445 a 686 de la SEQ ID 1. (= serina proteasa).
- 55 15. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4.
16. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
- 60 17. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo a menos del 20 % de la deposición de C4 de control.
18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 15 a 17, en el que dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo de individuos con actividad de deposición de C4.
- 65 19. El anticuerpo de acuerdo con la realización 18, en el que dicho anticuerpo está presente en una concentración en el intervalo de 1 µg/ml a 500 µg/ml.

20. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 4.
- 5 21. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 5.
- 10 22. El anticuerpo de acuerdo con la realización 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 5.
- 15 23. Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 20 24. Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 25 25. Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia que es al menos en un 90 % homóloga a la SEQ ID 5.
- 30 26. Un anticuerpo que comprende una o más CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en
- 1) CDR1 de la cadena pesada de la SEQ ID 6;
  - 2) CDR2 de la cadena pesada de la SEQ ID 7;
  - 3) CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID 8;
  - 4) CDR1 de la cadena ligera de la SEQ ID 9;
  - 5) CDR2 de la cadena ligera de la SEQ ID 10; y
  - 6) CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID 11.
- o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 35 27. Un método de producción de un anticuerpo que reconoce específicamente y se une a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2 o un homólogo funcional de la misma, que comprende la etapa de administrar a un mamífero la parte C-terminal de la MASP-2 o un fragmento de la misma o un homólogo funcional de la misma.
- 40 28. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los dominios EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa.
- 45 29. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los dominios CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa.
- 50 30. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento de la misma comprende o consiste en los dominios CCP1, CCP2 y serina proteasa.
- 55 31. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento comprende o consiste en los dominios CCP2 y serina proteasa.
32. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento comprende o consiste en el dominio serina proteasa.
33. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los aminoácidos 136 a 686 de la SEQ ID 1. (= EGF, CUB2, CCP1, CCP2, serina proteasa)
34. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los aminoácidos 183 a 686 de la SEQ ID 1. (= CUB2, CCP1, CCP2, serina proteasa)
- 60 35. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento comprende o consiste en los aminoácidos 293 a 686 de la SEQ ID 1. (= CCP1, CCP2, serina proteasa).
- 65 36. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento comprende o consiste en los aminoácidos 363 a 686 de la SEQ ID 1. (= CCP2, serina proteasa)

37. El método de acuerdo con la realización 27, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 o fragmento comprende o consiste en los aminoácidos 445 a 686 de la SEQ ID 1. (= serina proteasa).
- 5 38. El método de acuerdo con la realización 27, en el que el mamífero es un roedor.
39. El método de acuerdo con la realización 27, en el que el método además comprende aislar células productoras de anticuerpos de dicho mamífero, preparar células de hibridoma a partir de dichas células productoras de anticuerpos, cultivar dichos hibridomas y aislar los anticuerpos producidos por dichos hibridomas.
- 10 40. El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 27 a 39, en el que dicho epítipo es un epítipo reconocido por uno o más anticuerpos de referencia seleccionados entre el grupo que consiste en
- 15 i. El anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito 03050904;  
 ii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM029;  
 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM035;  
 iv. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM046; y  
 v. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma designada M0545YM048.
- 20 41. El método de acuerdo con la realización 40, en el que el método comprende, además, identificar y seleccionar anticuerpos que reconozcan dichos epítipos.
42. El método de acuerdo con la realización 40, en el que el método comprende, además, seleccionar anticuerpos de ensayo que reconozcan dichos epítipos mediante la realización de las etapas de
- 25 1) Proporcionar la MASP-2 o un fragmento de la misma que comprende el epítipo reconocido por dicho anticuerpo de referencia; y  
 2) Añadir un anticuerpo de ensayo y dicho anticuerpo de referencia contra dicha MASP-2, en el que el anticuerpo de ensayo o el anticuerpo de referencia se marca con un marcador detectable o ambos anticuerpos se marcan con diferentes marcadores detectables; y  
 30 3) Detectar la presencia del marcador detectable contra la MASP-2  
 4) Detectar de este modo si el anticuerpo de ensayo es capaz de desplazar el anticuerpo de referencia  
 5) Seleccionar anticuerpos de ensayo capaces de desplazar el anticuerpo de referencia
- 35 43. El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 27 a 42, en el que el método comprende además anticuerpos de ensayo si dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo y anticuerpos seleccionados capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
- 40 44. El método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 27 a 42, en el que el método comprende, además, anticuerpos de ensayo si dicho anticuerpo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo y anticuerpos seleccionados capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
45. Un anticuerpo producido de acuerdo con el método de cualquiera de las realizaciones 27 a 44.
- 45 46. Un método de inhibición de la actividad de la MASP-2 que comprende las etapas de
- 50 1) Proporcionar una composición que comprende la MASP-2;  
 2) Proporcionar un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 25 y 44;  
 3) Incubar dicha composición con dicho anticuerpo, inhibiendo de este modo la actividad de la MASP-2.
47. El método de acuerdo con la realización 46, en donde la composición es suero.
48. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un equivalente funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 26 y 45 y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 55 49. Un medicamento para el tratamiento de una afección clínica que comprende el anticuerpo o un equivalente funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 26 y 45 como ingrediente activo.
- 60 50. El medicamento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica es la lesión por isquemia/reperfusión.
- 51.
- 65 52. El medicamento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica es una enfermedad inflamatoria crónica.

53. El medicamento de tratamiento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica es una enfermedad inflamatoria autoinmune.
54. El medicamento de tratamiento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica se caracteriza por la pérdida masiva de células debido a la apoptosis.
55. El medicamento de tratamiento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica es la lesión por isquemia/reperfusión.
56. El medicamento de acuerdo con la realización 55, en el que la lesión es el resultado de la ACTP (angioplastia coronaria transluminal percutánea) o IDAC (injerto de derivación de arteria coronaria).
57. El medicamento de tratamiento de acuerdo con la realización 55, en el que dicha lesión es un resultado del infarto agudo de miocardio o la isquemia cerebral.
58. El medicamento de tratamiento de acuerdo con la realización 49, en el que la afección clínica se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.
59. Uso del anticuerpo o un equivalente funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 26 y 45 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección clínica en un individuo que lo necesite.
60. Uso de acuerdo con la realización 59, en el que la afección clínica es la lesión por isquemia/reperfusión.
61. Uso de acuerdo con la realización 60, en el que la lesión es un resultado de la ACTP (angioplastia coronaria transluminal percutánea) o el IDAC (injerto de derivación de arteria coronaria).
62. Uso de acuerdo con la realización 60, en el que dicha lesión es un resultado del infarto agudo de miocardio o la isquemia cerebral.
63. Uso de acuerdo con la realización 59, en el que la afección clínica se selecciona entre el grupo que consiste en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

## Ejemplo

### Ejemplo 1

*Anticuerpo anti-MASP-2 monoclonal:*

- Se inyectó subcutáneamente a ratas Wistar hembra (de 8 semanas de edad) con 3 µg de dominio CCP1-CCP2-serina proteasa de MASP-2 humana recombinante (CCP1/2-SP) (Rossi et al., 2001) emulsionado en adyuvante completo de Freund y se repitió tres veces con 3 µg de CCP1/2-SP en adyuvante de Freund incompleto. Tres días antes de la extracción del bazo, las ratas se reforzaron por vía intravenosa con 3 µg de CCP1/2-SP en solución salina. La fusión de una suspensión de células de bazo con células de mieloma (X63-Ag8.653) y el cultivo sobre células alimentadoras de ratón fueron como se describe (Liu et al., 2001).

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

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

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

- Se separó una preparación de MBL/MASP en SDS-PAGE seguida de la transferencia sobre una membrana de PVDF. Los anticuerpos seleccionados se sometieron a ensayo para reconocer la MASP-2 en la mancha de

transferencia. Se identificaron anticuerpos inhibidores mediante la exploración para determinar la inhibición de la deposición de C4 catalizada por MASP-2, como se describe a continuación en el presente documento en el Ejemplo 2.

5 El sobrenadante del cultivo de las estirpes celulares de hibridoma que producían los anticuerpos seleccionados se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante se tamponó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, EDTA 10 mM, pH 7. Se hicieron pasar cien ml de sobrenadante a través de una columna de Ig anti-bovina de 1 ml (5 mg de Ig anti-bovina (Dako) por ml de partículas de Sepharose 4B activadas con CNBr (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia)) equilibrada en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4 (PBS) con EDTA 10 mM (PBS/EDTA). El efluente se hizo pasar por una columna de Sepharose de proteína G de 1 ml (Amersham Bioscience) pre-lavada con glicina 0,1 M, pH 2,5 y se re-equilibró con PBS/EDTA. Las columnas fueron lavadas con 30 ml de PBS/EDTA y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,5. El eluato se recogió en fracciones de 0,5 ml en 40  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 1 M, pH 8,5.

## 15 **Ejemplo 2**

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

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

#### 1) Preparación de pocillos de microtitulación recubiertos de manano:

25 Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos (FluroNunc, Nalgene Nunc Int., Dinamarca) con manano (10 mg/l, Sigma Chemical Co., San Luis, EE.UU.) en un tampón de recubrimiento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 3,18 g/l;  $\text{NaHCO}_3$ : 5,86 g/l; pH ajustado a 9,6 usando HCl) durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavan dos veces en TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH ajustado a 7,4 usando HCl). A continuación se bloquean los pocillos mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón como el anterior excepto porque se añade 1 mg/ml de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca). Los pocillos se lavan 3 veces en TBST+ $\text{Ca}^{2+}$  (Tris 10 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM; Tween 20 0,05 %, pH ajustado a 7,4 usando HCl, a partir de aquí, tampón de lavado) y ya están listos para usarse.

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

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

#### 3) Exploración para determinar la inhibición de la deposición de C4 catalizada por la MASP-2:

45 La sustancia que va a ser escrutada para inhibición de actividad (por ejemplo sobrenadante de cultivo celular de hibridoma, anticuerpo purificado) se añade a rMBL/rMASP-2 unido a pocillos de microtitulación recubiertos de manano en el anterior tampón de lavado, excepto porque se añade 1 mg/ml de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan 3 veces en tampón de lavado y se incuban 1,5 h a 37 °C con componente C4 de complemento humano purificado (aproximadamente 1,5-2 ng/ml) en un tampón de barbital sódico (5 mM), NaCl (181 mM),  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1,25 mM), pH 7,4, se añade 11 mg/ml de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca) antes del uso. Los pocillos se lavan 3 veces con tampón de lavado y se añaden 0,89 mg/l de componente C4c de complemento anti-humano de conejo biotinilado (Dako, Dinamarca, biotinilado de acuerdo con los procedimientos estándar). Los pocillos son incubados durante 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Se añade estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) a una concentración de 0,1 mg/l en el anterior tampón de lavado excepto porque se omite el calcio y se incluye EDTA 50  $\mu\text{M}$ . Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Los pocillos se revelan añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de Disolución Potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se hace el recuento de los pocillos en un contador Wallac Victor 2<sup>d</sup> Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

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

**Ejemplo 3****Ensayo de inhibición de la deposición de C4 catalizada por la MASP-2 en suero completo:**

5 La muestra de suero que va a analizarse se diluye 250 veces (concentración final) en el anterior tampón de barbital y se añade C4 (1,5-2 ng/ml, concentración final). Se añade la sustancia que se va a explorar para determinar la actividad de inhibición (por ejemplo el anticuerpo purificado) y las muestras se incuban entre 5 minutos y 2 horas a 37 °C. Normalmente, la incubación es de 15 minutos. Se añaden 100 µl a pocillos de microtitulación recubiertos de manano preparados como se ha descrito anteriormente y se incuban 1 h ½ a 37 °C. Los pocillos se lavan 3 veces en el anterior tampón de lavado y se añaden 0,89 mg/l de componente C4c de complemento anti-humano de conejo biotinilado (Dako, Dinamarca, biotinilado de acuerdo con procedimientos convencionales). Los pocillos se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Se añade estreptavidina marcada con europio (Wallac, Turku, Finlandia) en una concentración de 0,1 mg/l en el anterior tampón de lavado excepto porque se omite el calcio y se incluye EDTA 50 µM. Los pocillos se incuban 1 h a temperatura ambiente y se lavan 3 veces en tampón de lavado. Los pocillos se revelan añadiendo 100 µl de disolución potenciadora Delfia (Perkin Elmer Wallac, Norton, EE.UU.) y se incuban en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se someten a recuento con un contador Wallac Victor 2<sup>d</sup> Multi 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

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

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

**Ejemplo 4****Composición farmacéutica**

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

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

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

**Ejemplo 5****Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón anti-huMASP-2 inhibidores**Inmunización

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

Hibridación, fusión

55 Las fusiones se realizaron usando una metodología convencional. Los linfocitos esplénicos del animal que mejor respondió se fusionaron con la estirpe celular Sp2/O-Ag-14 usando PEG (polietilenglicol), y los hibridomas resultantes se sembraron en placas de 96 pocillos en medio HAT.

60 El medio se cambió 2-3 veces antes de la exploración. Por lo general, las colonias de hibridoma estaban listas para la exploración en 3-5 semanas. Los sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar la presencia de anticuerpo inhibidor mediante el ensayo de deposición de C4. Los hibridomas se subclonaron mediante dilución limitante.

65 Se exploraron 785 clones primarios para determinar la actividad de inhibición y se seleccionaron 50 clones inhibidores para la subclonación. Los subclones se exploraron para determinar la inhibición y los clones que mostraron la mayor actividad inhibidora se subclonaron nuevamente. Tras 2 a 3 subclonaciones, quedaron 4 clones inhibidores de interés (véase la Tabla 1 en el presente documento a continuación).

Ensayo de inhibición de deposición de C-4

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

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

Preparación de pocillos de microtitulación recubiertos de manano:

Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos (FluroNunc, Nalgene Nunc Int., Dinamarca) con manano (10 mg/l, Sigma Chemical Co., San Luis, EE.UU.) en un tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 3,18 g/l; NaHCO<sub>3</sub>: 5,86 g/l; pH ajustado a 9,6 usando HCl) durante una noche a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan 2 veces en TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,4 usando HCl). Después los pocillos se bloquean por incubación durante 1 h a temperatura ambiente en un tampón como el anterior excepto porque se añade 1 mg/ml de albúmina humana (State Serum Institute, Copenhague, Dinamarca). Después los pocillos se lavan 3 veces en TBST (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH = 7,4 usando HCl) y ya están listos para su uso.

Preincubación de anticuerpos con suero humano:

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

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

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

Transferencia Western

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

ELISA competitivo de la MASP-2

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

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

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

Recubrimiento de placa de ELISA:

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

Los anticuerpos murinos se diluyen apropiadamente (0,2 y 1,0 µg/ml final) con tampón de lavado biotinilado. El NimoAb101 se diluye (0,2 µg/ml final) en tampón de lavado. Los anticuerpos de ratón diluidos se añaden

(100 µl/pocillo) a la placa recubierta de la MASP-2. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa de microtitulación se vacía.

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

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

15 Resultados

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

**Tabla 1**

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

20 Potencia de los nuevos anticuerpos

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

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

35 Cartografiado de epítomos

Transferencia Western:

40 Se realizaron transferencias Western con el objetivo de distinguir entre la unión de los anticuerpos a la cadena A N-terminal (parte de dimerización y unión a MBL) o a la cadena B C-terminal (parte serina proteasa de la MASP-2). Se desarrolló suero humano sobre SDS-PAGE reducido y se realizó la inmunodetección con los cuatro anticuerpos por separado. La MASP-2 no activada de longitud completa presentará una banda de 74 kDa, la cadena A y la cadena B presentan bandas de 47 kDa y 27 kDa, respectivamente. La Figura 6 muestra los resultados de las transferencias Western frente a la MASP-2 en suero humano usando los diferentes anticuerpos murinos.

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

50 ELISA competitivo

Con el objetivo de dilucidar si los anticuerpos comparten el mismo epítipo que el anticuerpo de rata NimoAb101, se ha realizado un ELISA competitivo. El ELISA se dirigió hacia la MASP-2 marcada con His recombinante usando un NimoAb101 biotinilado que compete contra dos concentraciones diferentes (0,2 y 1,0 µg/ml) de los anticuerpos de ratón.

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

**Ejemplo 6****Identificación y clonación de la región VH y VL del anticuerpo NimoAb101 expresado en células de hibridoma depositadas con el n.º de acceso de ECACC 03050904**

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

**Abreviaturas utilizadas**

V<sub>H</sub> = región variable de la cadena pesada de Ig; V<sub>L</sub> = región variable de la cadena ligera de Ig;  
 CDR = región determinante de la complementariedad; CDR1, CDR2 y CDR3 = tres regiones tanto en V<sub>H</sub> como en V<sub>L</sub>, que se numeran desde el extremo amino;  
 FR = región marco conservada; FR3 = tercera región marco conservada tanto en V<sub>H</sub> como en V<sub>L</sub>, numerada a partir del extremo amino;  
 scFv = fragmento de Fv monocatenario;  
 ADNc (ADN complementario) = una molécula de ADN de monocatenario que es complementaria en la secuencia de bases con una cadena de ARN;  
 5'RACE = amplificación rápida del extremo 5' del ADNc.

**Materiales y métodos****Aislamiento del ARN total y del ARNm**

Las células de hibridoma de la estirpe celular depositada con el número ECAAC 03050904 se distribuyeron en 4 tubos. Las células fueron aglomeradas y el sobrenadante se retiró. Dos de los tubos se congelaron a -80 °C.

Dos de los tubos se usaron para purificación de ARN usando el kit de ARN total de mamífero GenElute™ RTN70. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente. El ARN total también se purificó usando la purificación de ARN total con el kit NucleoSpin® RNA II: n.º de catálogo 740955.20 Macherey-Nagel. El rendimiento se determinó espectrofotométricamente.

Se aisló Poli(A) ARN a partir de ARN total con el kit NucleoTrap® mRNA: n.º de catálogo 740655 Macherey-Nagel.

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

**Construcción de ADNc****5'RACE**

La amplificación rápida de 5' de extremos de ADNc (RACE) se realizó usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó G<sub>RT</sub> para la transcripción inversa (RT, del inglés *reverse transcription*), y la amplificación se realizó con G<sub>3</sub>.

Los cebadores específicos de gen utilizados en este enfoque fueron:

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

**Construcción de plásmido: clonación de fragmentos de PCR**Plásmido parental:

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

El fragmento de PCR purificado se clonó en el vector usando la reacción Topo.

**Análisis de secuencia**

El ADN procedente de la mini-preparación de plásmido de cuatro clones recombinantes de VL y la mini-preparación de plásmido de seis clones recombinantes de VH se secuenció del injerto en ambas direcciones usando los cebadores de secuenciación convencionales M13F y M13R. Las dos secuencias respectivas de cada plásmido se ensamblaron en una estructura contig usando VNTI contig exprés. La parte fiable de las secuencias de consenso contig se importó a los archivos de la base de datos de ADN NTI.

Las estructuras orf de IgG relevantes se identificaron y se tradujeron.

### Alineamiento de secuencia y búsqueda blast

#### 5 **Análisis por ordenador**

El análisis de secuencia se realizó con VectorNTI de Informax Inc. usando el módulo Contig.

Las búsquedas BLAST se realizaron usando la página web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y del European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/homology.html>).

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

### 15 **RESULTADOS Y ANÁLISIS**

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

Definición de CRD de Kabat

<b>Cadena ligera</b>	CDR1: residuos 24-34
	CDR2: residuos 50-56
	CDR3: residuos 89-97
<b>Cadena pesada</b>	CDR1: residuos 31-35
	CDR2: residuos 50-65
	CDR3: residuos 95-102

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

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

#### 35 **REFERENCIAS**

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

#### 40 **Depósito biológico**

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

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

50 Una estirpe celular de hibridoma designada M0545YM035S2 (también denominada en el presente documento M0545YM035) se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania.

55 La estirpe celular es una estirpe celular de hibridoma derivada de una fusión de células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón. La referencia de identificación es N162-91A-01 a 12. Esta estirpe celular de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal, que en el presente documento se denomina NimoAb104 o "035" o Ab035. Las células se depositaron el 6 de mayo de 2004.

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

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

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

### Referencias

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

### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NatImmune A/S
- <120> Anticuerpos de la MASP-2
- 40 <130> P-772 PC00
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 686
- 45 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> SEQ ID 1

ES 2 629 344 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn  
 165 170 175

ES 2 629 344 T3

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg  
 180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu  
 195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile  
 210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu  
 225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly  
 245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn  
 260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly  
 275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala His Ala Cys Pro Tyr Pro Met  
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu  
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln  
 325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly  
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro  
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly  
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe  
 385 390 395 400

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

ES 2 629 344 T3

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro  
 420 425 430  
 Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly  
 435 440 445  
 Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly  
 450 455 460  
 Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr  
 465 470 475 480  
 Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp  
 485 490 495  
 Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala  
 500 505 510  
 Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly  
 515 520 525  
 Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile  
 530 535 540  
 Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser  
 545 550 555 560  
 Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr  
 565 570 575  
 Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile  
 580 585 590  
 Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro  
 595 600 605  
 Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly  
 610 615 620  
 Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu  
 625 630 635 640  
 Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly  
 645 650 655

ES 2 629 344 T3

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

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

5 <210> 2  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 3  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> SEQ ID 3

ES 2 629 344 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Ala Ala  
 130

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

5

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

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

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

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

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

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Pro Tyr

ES 2 629 344 T3

85

90

95

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

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

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

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

<210> 5

<211> 159

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> SEQ ID 5

ES 2 629 344 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met  
 1 5

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

15

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Ile  
 1 5

20

ES 2 629 344 T3

<210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
5 <400> SEQ ID 8

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

<210> 9  
10 <211> 11  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
<400> SEQ ID 9

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

<210> 10  
20 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
<400> SEQ ID 10

Asp Gly Asn Arg Leu Ala Asp  
1 5

<210> 11  
25 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus  
30 <400> SEQ ID 11

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 12  
35 <211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220><221> característica\_misclánea  
<223 Cebador de PCR

40 <400> 12  
ctcattcctg ttgaagctct tgacga 26

<210> 13  
<211> 21  
<212> ADN  
45 <213> Artificial  
<220><221> característica\_misclánea  
<223 Cebador de PCR

50 <400> 13  
aggctgcaa tcacctcac a 21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce específicamente y que se une a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes CDR:
- 10 1) CDR1 de la cadena pesada de la SEQ ID 6;  
2) CDR2 de la cadena pesada de la SEQ ID 7;  
3) CDR3 de la cadena pesada de la SEQ ID 8;  
4) CDR1 de la cadena ligera de la SEQ ID 9;  
5) CDR2 de la cadena ligera de la SEQ ID 10; y  
6) CDR3 de la cadena ligera de la SEQ ID 11; y
- 15 es capaz de inhibir la deposición de C4.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona entre el grupo que consiste en los fragmentos Fab, Fab', F (ab') 2 y Fv.
- 20 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la MASP-2 es MASP-2 humana como se identifica por la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir la deposición de C4 en suero completo a menos del 20 % de la deposición de C4 control.
- 30 7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los dominios EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y SP.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo ha sido humanizado.
- 35 9. Un método de selección de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reconozca específicamente y se una a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2, comprendiendo el método:
- 40 (a) someter a ensayo si (i) anticuerpos aislados de un mamífero al que se le ha administrado la parte C-terminal de la MASP-2 o un fragmento de la misma, o (ii) anticuerpos producidos usando tecnología recombinante determinados para que se unan a la parte C-terminal de la MASP-2 son capaces de inhibir la deposición de C4; y (b) seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la deposición de C4 en suero completo.
- 45 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha parte C-terminal de la MASP-2 comprende o consiste en los dominios EGF, CUB2, CCP1, CCP2 y serina proteasa.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el método además comprende aislar células productoras de anticuerpos de dicho mamífero, preparar células de hibridoma a partir de dichas células productoras de anticuerpos, cultivar dichos hibridomas y aislar los anticuerpos producidos por dichos hibridomas.
12. El método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente la etapa de determinar si dichos anticuerpos seleccionados reconocen el mismo o un epítipo solapado como uno o más anticuerpos de referencia en un ensayo que implica las etapas de:
- 55 • proporcionar la MASP-2 o un fragmento de la misma que comprende el epítipo reconocido por dicho anticuerpo de referencia;  
• añadir el anticuerpo seleccionado y el anticuerpo de referencia contra dicha MASP-2, en el que el anticuerpo seleccionado y/o el anticuerpo de referencia están marcados con un marcador detectable;  
• detectar la presencia del marcador detectable en la MASP-2  
60 • detectar de este modo si el anticuerpo seleccionado es capaz de desplazar el anticuerpo de referencia;
- en el que el anticuerpo seleccionado reconoce el mismo o un epítipo solapado si el anticuerpo de referencia se desplaza,  
en el que el anticuerpo de referencia se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 65

- 5 i. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito 03050904;  
ii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2657;  
5 iii. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2660;  
iv. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2658; y  
10 v. el anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC 2659.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el método además comprende seleccionar anticuerpos capaces de desplazar al menos uno de dichos anticuerpos de referencia.

- 15 14. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce específicamente y que se une a un epítipo dentro de la parte C-terminal de la MASP-2, y que inhibe la deposición de C4, en el que dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es una molécula de anticuerpo humanizado que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina producida por una estirpe celular de hibridoma seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 20 i. la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2657;  
ii. la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2660;  
iii. la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC2658; y  
25 iv. la estirpe celular de hibridoma depositada con el número de depósito DSM ACC 2659.

- 15 15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 14.

- 30 16. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 14 para su uso en el tratamiento de una afección clínica seleccionada entre el grupo que consiste en una lesión por isquemia/reperfusión, una enfermedad inflamatoria crónica y una afección inflamatoria autoinmune.