

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 616**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2014 PCT/NL2014/050327**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14189378**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014 E 14729463 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2999714**

54 Título: **Moléculas de unión que se unen al factor C2 del complemento y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**23.05.2013 EP 13168941**

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

**29.09.2020**

73 Titular/es:

**BROTEIO PHARMA B.V. (100.0%)**

**Yalelaan 46**

**3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**HACK, CORNELIS ERIK;**

**YILDIZ, CAFER;**

**BOON, LOUIS y**

**SIMONS, PETRUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 784 616 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

Moléculas de unión que se unen al factor C2 del complemento y usos de las mismas

5 La invención se refiere al campo de la inmunología/bioquímica. La invención se refiere a medios y métodos para inhibir la activación de las vías clásica y de las lectinas del sistema del complemento y a su uso en el tratamiento de afecciones humanas. La invención se refiere a inhibidores de factores del complemento y usos de los mismos. La invención se refiere en particular a moléculas de unión que se unen al factor C2 del complemento humano y a sus  
10 usos en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos mediados por la activación del complemento, tales como enfermedades inflamatorias mediadas por anticuerpos y lesiones por isquemia-reperfusión (I/R) en afecciones isquémicas.

15 El sistema del complemento implica proteínas que circulan en la sangre. Los factores del complemento circulan como proteínas precursoras inactivas. La activación del sistema conduce a una cascada de activación en la que un factor activa el siguiente mediante la proteólisis específica de la proteína del complemento aguas abajo en la cascada. El sistema del complemento pertenece a los llamados sistemas de cascada de plasma. El sistema del complemento está implicado entre otros en la defensa del anfitrión contra los microorganismos invasores.

20 La activación del sistema del complemento se puede producir a través de tres vías, la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. Cada vía activa un componente central, C3 o el tercer factor del complemento, lo que da como resultado la activación de una vía terminal común que conduce a la formación del complejo de ataque de membrana (Muller-Eberhard, Annu Rev Biochem 1988, 57:321). Durante la activación del complemento, se generan varios péptidos inflamatorios como las anafilatoxinas C3a y C5a, así como el complejo de ataque de membrana, C5b-9. Estos productos de activación provocan efectos biológicos pleiotrópicos tales como quimiotaxis de leucocitos, desgranulación de células fagocíticas, mastocitos y basófilos, contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular y lisis de las células (Hugli, Complement 1986, 3:111) Los productos de activación del  
25 complemento también inducen la generación de radicales tóxicos de oxígeno y la síntesis y liberación de metabolitos y citocinas del ácido araquidónico, en particular por los fagocitos, que amplifica adicionalmente la respuesta inflamatoria.

30 Aunque el complemento es una importante línea de defensa contra los organismos patógenos, su activación también puede conferir daño a las células anfitrionas que de otro modo serían sanas. El daño tisular mediado por el complemento desempeña un papel en muchas enfermedades inflamatorias, incluida la sepsis, enfermedades del complejo inmunitario como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la vasculitis, traumatismos múltiples, varias enfermedades neurológicas tales como la neuropatía motora multifocal, la lesión por isquemia-reperfusión (I/R) como durante el infarto de miocardio, etc. El papel patogénico de la activación del complemento en estas afecciones es el resultado de uno o más de los efectos biológicos antes mencionados de sus productos de activación. La inhibición de la activación del complemento es, por lo tanto, beneficiosa en estas condiciones.

40 La activación del complemento puede ser inhibida por inhibidores naturales que controlan la activación en varios niveles de la cascada. Estos inhibidores incluyen el inhibidor C1, que inhibe los primeros pasos de activación de las vías clásica y de las lectinas, la proteína de unión al factor H y C4 que disocian las convertasas C3 y C4, respectivamente, y actúan como cofactores para el factor I que degrada C4b y C3b, las proteínas reguladoras de membrana CR1, DAF y MCP que ejercen funciones similares a H, y las proteínas plasmáticas vitronectina y clusterina y la proteína de membrana CD59 que inhiben la MAC (Sahu et al., Immunol Res 1998, 17:109; Campbell et al., Annu Rev Immunol 1988,6:161).

50 La inhibición de la activación del complemento es una opción terapéutica atractiva. De hecho, varios inhibidores del complemento soluble endógeno (inhibidor de C1; receptor 1 del complemento soluble o sCR1) se han producido como una proteína recombinante y se han evaluado en estudios clínicos. Asimismo, se ha evaluado la administración de anticuerpos que inhiben las proteínas clave de la reacción en cascada como C5 (Thomas et al., Mol Immunol 1996, 33:1389). Uno de estos anticuerpos, Soliris® o eculizumab, es un anticuerpo anti-C5. El anticuerpo está actualmente aprobado para su uso en el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna y el síndrome urémico hemolítico atípico.

55 Una función del complemento es facilitar la fagocitosis de los microorganismos invasores. Por lo tanto, la inhibición del complemento en enfermedades inflamatorias tiene la desventaja inherente de que aumenta el riesgo de infecciones. Tanto la vía de las lectinas como la vía alternativa de activación del complemento pueden ser activadas directamente por microorganismos, mientras que la vía clásica es activada por anticuerpos IgG o IgM unidos a antígenos, por ejemplo, de microorganismos.

60 Huda et al. (Complement C2 siRNA mediated therapy of myasthenia gravis in mice. Journal of Autoimmunity 42: pág. 94-104) describen el uso de la interferencia de ARN para suprimir la expresión de C2 *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón de miastenia gravis. Se sugiere que el silenciamiento de C2 mediado por ARNip podría ser eficaz para el

tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

El documento WO01/70818 describe inhibidores, particularmente moléculas de anticuerpos, que se unen a C2a y bloquean la actividad funcional de C2a en la activación del complemento.

5 Stenbaek et al. (Human complement component C2: production and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against C2. *Molecular Immunology* 23(8): pág. 879-886) informan sobre la generación y prueba de anticuerpos que se unen a C2. No hay evidencia de que los clones puedan bloquear la activación de C2.

10 Anderson et al. (A monoclonal antibody against human complement component C2. *Biochemical Society Transactions* 15(4) pág. 660-661) describen un anticuerpo monoclonal que se une al fragmento C2a de C2.

15 Oglesby et al. (Radioassays for quantitation of intact complement proteins C2 and B in human serum. *Journal of Immunological Methods* 110(1) pág. 55-62) describe la producción de IgG1k anti-C2b murina mediante inmunización de ratones DBA/I con C2 humano desglicosilado. No hay evidencia de que el anticuerpo pueda inhibir la escisión de C2.

20 Heinz et al. (Monoclonal antibodies against components of the classical pathway of complement. *Complement and Inflammation* 6(3): pág. 166-174) es una revisión que describe la activación de la vía clásica del complemento. Se examinan los anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas complementarias, incluido C2.

### Compendio de la invención

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y otros aspectos o realizaciones cualesquiera establecidos en la presente memoria tienen solo fines informativos.

La presente invención proporciona una molécula de unión que se une al factor C2 del complemento humano, en donde la molécula de unión comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en donde la región variable de cadena pesada comprende:

30 (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;  
 (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y  
 (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y en donde la región variable de cadena ligera comprende:

35 (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;  
 (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y  
 (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en donde la molécula de unión se une al dominio C2b del factor de complemento humano C2. En una realización, la molécula de unión comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina

40 (a) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 resp.; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 96 resp.; o  
 45 (b) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 102 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 102 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 102 resp.; o SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 102 resp.; o  
 50 (c) que comprende las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) y/o (b) pero en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 1-5 sustituciones de aminoácidos y en donde las 1-5 sustituciones de aminoácidos no están en las regiones CDR.

55 Oglesby et al. (*J Immunol* 1988, 2: 926) describen un anticuerpo específico para C2. El anticuerpo se identificó tras la inmunización de ratones con C2 desglicosilado y desnaturalizado. La inmunización con C2 glicosilado nativo no produjo anticuerpos específicos de C2 adecuados. Un anticuerpo específico C2 también se describe en el documento US2001/0026928. El anticuerpo desarrollado allí está dirigido al subcomponente C2a de C2. No se dan a conocer detalles adicionales sobre el epítipo reconocido por el anticuerpo.

60 Una molécula de unión de la invención difiere en el epítipo al que está unido sobre C2. Antes de la invención no se sabía que había más epítopos inactivadores sobre C2.

Las moléculas de unión de la invención inhiben la activación del complemento y se pueden utilizar en el tratamiento de una variedad de enfermedades. La invención proporciona una molécula de unión de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad mediada por la activación del complemento, comprendiendo dicho método administrar al individuo que lo necesite una molécula de unión de la invención. La invención proporciona adicionalmente una molécula de unión de la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediados por la activación del complemento a través de la vía clásica y/o de las lectinas. Los ejemplos de tales enfermedades son las enfermedades inflamatorias, las enfermedades neurológicas o la lesión por isquemia-reperusión (I/R). Una enfermedad neurológica preferida en el contexto de la invención es la enfermedad neuroinflamatoria. Una molécula de unión de la invención no inhibe completamente el complemento. Deja intacta al menos parte de la capacidad del sistema del complemento para defenderse contra los microorganismos. Una molécula de unión de la invención deja al menos la vía alternativa de activación del complemento esencialmente intacta. Esta característica de las moléculas de unión de la invención mejora en gran medida la aplicabilidad terapéutica de los inhibidores del complemento de la invención en general, y de los inhibidores del complemento basados en anticuerpos en particular. Los ejemplos preferidos de tratamientos según la invención son el rechazo de aloinjertos de riñón mediado por anticuerpos, la nefropatía membranosa idiopática, la anemia hemolítica inmunitaria, las enfermedades del complejo inmunitario, las afecciones de isquemia-reperusión tales como la lesión por isquemia-reperusión. Las moléculas de unión de la invención son opciones atractivas para su uso en una variedad de intervenciones terapéuticas debido a que son eficaces en la limitación de las consecuencias de la actividad del sistema del complemento en el organismo al tiempo que reducen el riesgo de efectos secundarios debido a la susceptibilidad a la infección y/o multiplicación de microorganismos.

La molécula de unión de la invención se une a un epítipo del dominio C2b. Tales moléculas de unión son eficaces a pesar del hecho de que no inhiben completamente la escisión por C1s. Una molécula de unión a C2b de la invención deja intacta la unión de C2a a C4b. No obstante, la actividad de C2 resulta inhibida significativamente por una molécula de unión a C2b de la invención.

Una molécula de unión de la invención es preferiblemente un fragmento Fab, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "molécula de unión que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera" abarca, pero no se limita a, un anticuerpo y un fragmento de unión a antígeno del mismo. Un fragmento preferido es un fragmento Fab, un fragmento scFv, un Unibody, un diacuerpo, un triacuerpo, etc.

Una molécula de unión de la invención se une a C2 humano. La secuencia de aminoácidos de un C2 humano preferido se proporciona en SEQ ID: NO 1. La molécula de unión preferiblemente se une específicamente a C2 humano. Esto significa que, en una muestra humana natural, preferiblemente una muestra de plasma humano, la molécula de unión se une más de 95%, preferiblemente más de 99% a C2 humano, en comparación con otras proteínas humanas en plasma, y tiene una afinidad de 20 nM o menos para C2.

La activación de C2 implica la escisión proteolítica en fragmentos más pequeños. Estos fragmentos generalmente se denominan fragmentos C2a y C2b. La terminología utilizada en esta invención es que el fragmento C2a es el fragmento más grande de aproximadamente 70 kDa. El fragmento C2a forma un complejo con C4b para formar una C3-convertasa C4bC2a. Este complejo está típicamente unido a la superficie. El fragmento C2b N-terminal más pequeño de aproximadamente 30 kDa se libera en la fase fluida.

El término "actividad C2" o similar Como se emplea en la presente memoria se refiere al papel de la proteína C2 en la cascada de activación del complemento. La proteína C2 es "activa" cuando ha cambiado de una enzima precursora inactiva a una serina proteasa activa tras la activación mediante escisión proteolítica por C1s. El C2 activo con C4b como cofactor puede activar C3, y con C4b y C3b como cofactor puede activar C5.

El término "inhibición de C2" o similar, Como se emplea en la presente memoria, también se refiere a su papel en la cascada de activación del complemento. La proteína C2 se "inhibe" cuando no cumple su función en la cascada para activar el complemento cuando la señal de activación de C2 (es decir, C1s) está presente en su entorno.

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales. El anticuerpo se puede preparar a partir de la sangre de un animal. Actualmente, es más común tener el anticuerpo preparado por una célula que expresa el anticuerpo del ácido nucleico en la célula. Están disponibles varias células y líneas celulares. Las líneas celulares de hibridoma se utilizaban comúnmente para la producción de anticuerpos monoclonales murinos. Con el advenimiento de los enfoques de ADN recombinante, hoy en día es común utilizar líneas celulares. Las líneas celulares preferidas son la línea celular PER.C6, la línea celular CHO y la línea celular NSO. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monovalente, un anticuerpo tetravalente u otro anticuerpo multivalente. Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente que comprende el sitio de unión al antígeno C2 como se indica aquí anteriormente.

En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo multiespecífico. El prototipo de anticuerpo

multiespecífico es el anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo multiespecífico comprende dos o más sitios de unión a antígeno diferentes. En tal anticuerpo multiespecífico, una molécula de unión de la invención proporciona al menos uno de los sitios de unión al antígeno. Al menos otro sitio de unión a antígeno es un sitio de unión a antígeno dirigido hacia un epítipo diferente sobre C2, o preferiblemente, dirigido hacia un epítipo sobre una molécula diferente. El otro sitio de unión a antígeno es preferiblemente una región variable de anticuerpo. Un anticuerpo bi-específico de la invención comprende una molécula de unión de la invención y al menos otra región variable de anticuerpo (cadena pesada y ligera) específica para otro epítipo sobre C2 o un epítipo sobre una molécula diferente.

El fragmento de unión al antígeno (fragmento Fab) es un fragmento de un anticuerpo que se une a los antígenos. Se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Estos dominios dan forma al sitio de unión a antígeno. Los dos dominios variables se unen al epítipo sobre sus antígenos específicos. Se pueden generar fragmentos Fab en el laboratorio. Actualmente, están disponibles varias enzimas para cortar el fragmento de un anticuerpo. En la presente invención, el término fragmento Fab se refiere a fragmentos Fab de dominio variable único y al fragmento F(ab')<sub>2</sub> que contiene dos dominios variables. El término fragmento Fab se utiliza para reflejar el fragmento cuando se divide de un anticuerpo, y a un fragmento similar pero producido directamente como tal a partir de una o más regiones codificantes, expresadas por una célula.

Como se emplea en la presente memoria, el término "Fv de cadena sencilla", también denominado scFv, se refiere a los anticuerpos modificados genéticamente preparados mediante el aislamiento de los dominios de unión (tanto cadenas pesadas como ligeras) de un anticuerpo de unión, y suministrando un radical de unión que permite la preservación de la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solo esa porción del dominio hipervariable necesaria para unirse al antígeno. La determinación y construcción de anticuerpos de cadena sencilla se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.946.778 de Ladner et al.

Se pretende que el término "K<sub>D</sub>" (M), como se emplea en la presente memoria, se refiera a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera como se especifica en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; resp. son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5F2.4. Las regiones variables de cadena pesada y ligera como se especifica en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11; resp. son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 13. Las regiones variables de cadena pesada y ligera como se especifica en SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19; resp. son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 32. Las regiones variables de cadena pesada y ligera como se especifica en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27; resp. son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 35. Las regiones variables de cadena pesada y ligera como se especifica en SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35; resp. son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 60. La región variable de cadena ligera como se especifica en SEC ID NO: 96 es una secuencia de aminoácidos consenso de ratón de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5F2.4. La región variable de cadena pesada como se especifica en SEQ ID NO: 97 es la secuencia de aminoácidos consenso de ratón de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 35. La región variable de cadena pesada como se especifica en SEQ ID NO: 98 es la secuencia de aminoácidos de ratón consenso de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 60. SEQ ID NO: 99-102 son secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera humanizadas VL1-4 de 5F2.4. SEQ ID NO: 103-106 son secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena pesada humanizadas VH1-4 de 5F2.4. SEQ ID NO: 107-110 son secuencias de ADNc que codifican la cadena ligera κ humanizada 5F2.4 que contiene VL1-VL4 humanizadas. SEQ ID NO: 111-114 son secuencias de ADNc que codifican la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH1-VH4 humanizadas. SEQ ID NO: 115-118 son secuencias de aminoácidos que codifican la cadena ligera κ humanizada 5F2.4 que contiene VL1-VL4 humanizadas. SEQ ID NO: 119-122 son secuencias de aminoácidos que codifican la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH1-VH4 humanizadas.

Una región variable ligera o pesada de inmunoglobulina en la molécula de unión de la invención puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; 3; 96, 99-106 con 1-5 sustituciones de aminoácidos, siempre que las sustituciones de aminoácidos no se encuentren en las regiones CDR. Una molécula de unión de la invención con tales regiones variables de cadena pesada sustituidas, regiones variables de cadena ligera sustituidas o ambas tiene las mismas características de unión al antígeno C2 en cuanto a la clase, no necesariamente en cuanto a la cantidad. La molécula de unión se une al mismo epítipo que la molécula de unión original. Las sustituciones de 1 a 5 aminoácidos permiten, entre otras, la generación de la versión inmunizada de la molécula de unión. La desinmunización para su uso en sujetos humanos generalmente se puede lograr modificando la cadena pesada en un máximo de 5 lugares, la cadena ligera en un máximo de 5 lugares o ambas. La desinmunización de una región variable murina es una tecnología establecida y siempre produce una molécula de unión con una menor probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria en un ser humano. El número de sustituciones de aminoácidos que se requieren para lograr este resultado es típicamente menor de 5 en cada cadena. A menudo, la sustitución de 1, 2 o 3 aminoácidos en cada cadena es suficiente para obtener una molécula de unión de la invención con una menor probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria en un ser humano en comparación con la secuencia o secuencias

no modificadas.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano o humanizado. Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "anticuerpo humano" incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, p. ej. mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" significa que al menos una porción de las regiones marco de una construcción de inmunoglobulina o anticuerpo modificado se obtiene a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. Debe quedar claro que se puede utilizar cualquier método para humanizar anticuerpos o construcciones de anticuerpos, como por ejemplo mediante la remodelación de la superficie de dominios variables (Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91: 969) o injerto o remodelación de CDR (Hurle et al., Curr Opin Biotechnol 1994, 5: 428). El anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención comprende las regiones CDR del anticuerpo 5F2.4 en el contexto de un marco de anticuerpos por lo demás humano. Por lo tanto, la invención también proporciona un anticuerpo humano que comprende una región variable de cadena pesada humana con la secuencia CDR1-3 de SEQ ID NO: 4-6 y una región variable de cadena ligera humana con la secuencia CDR1-3 de SEQ ID NO: 7-9. Las secuencias CDR injertadas están, por supuesto, situadas apropiadamente, es decir, la región CDR1 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 4 toma el lugar de la región CDR1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humano utilizado para el procedimiento de injerto. La región CDR2 de SEQ ID NO: 5 toma el lugar de la región CDR2 de la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo humano y así sucesivamente.

En una realización preferida, la región variable de cadena ligera humanizada en un anticuerpo humano que comprende las CDR de anticuerpo 5F2.4 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 99, 100, 101 o 102 opcionalmente con 1-5 sustituciones de aminoácidos. En una realización preferida, la región variable de cadena pesada humanizada en un anticuerpo humano que comprende las CDR de anticuerpo 5F2.4 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 103, 104, 105 o 106 opcionalmente con 1-5 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, no están en una región CDR.

En una realización preferida, el anticuerpo humano que comprende las CDR del anticuerpo 5F2.4 comprende una cadena  $\kappa$  ligera humanizada de SEQ ID NO: 115, 116, 117 o 118 opcionalmente con 1-5 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, no están en una región CDR. En una realización preferida, el anticuerpo humano que comprende las CDR del anticuerpo 5F2.4 comprende una cadena de IgG4 humanizada de SEQ ID NO: 119, 120, 121 o 122 opcionalmente con 1-5 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, no están en una región CDR.

Como se emplea en la presente memoria, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a una construcción de anticuerpo modificado genéticamente que comprende dominios variables de una especie (tales como dominios variables de ratón, rata, cabra, oveja, vaca, llama o camello), que pueden desinmunizarse, humanizarse o no, y dominios constantes de otra especie (tales como primates no humanos o dominios constantes humanos) (para su revisión véase Hurle et al., Curr Opin Biotechnol 1994, 5: 428). Debe quedar claro que se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para desarrollar anticuerpos quiméricos o construcciones de anticuerpos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "desinmunizado" o "desinmunización" se refiere a la identificación y posterior eliminación de un epítipo de células T en una molécula de unión de la invención. Típicamente, aunque no necesariamente esto se realiza en la región variable de un anticuerpo de la invención. De nuevo a menudo, pero no siempre es necesario, esto se hace en una región marco y, por lo tanto, fuera de las regiones CDR. La eliminación de un epítipo de células T se logra típicamente mediante la sustitución de uno o más aminoácidos que codifican el epítipo de células T. La secuencia se transforma así en una secuencia diferente de un epítipo de células T. Una región variable desinmunizada típicamente contiene 1-5 sustituciones de aminoácidos. Los aminoácidos sustituidos se seleccionan de manera que la estructura terciaria de la región variable no se altere significativamente. Por lo tanto, el aminoácido sustituido se selecciona típicamente del mismo grupo de aminoácidos (es decir, neutro, cargado positivo, cargado negativo, lipófilo). Cuando está disponible en el mismo grupo, un aminoácido se sustituye por un aminoácido que en un anticuerpo humano estructuralmente cercano está en la misma posición o en una posición similar en la región variable.

La molécula de unión de la invención es preferiblemente un anticuerpo humanizado o Desinmunizado.

Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, tal como el anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En una realización preferida, las regiones constantes de un anticuerpo de la invención son las regiones constantes

de un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, tal como el anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las regiones constantes pueden comprender modificaciones tales como sustituciones de aminoácidos para conferir propiedades específicas a las regiones constantes. Por ejemplo, la mutación de la región bisagra de IgG4 para hacer que el anticuerpo sea más estable al intercambio de medias moléculas. Otras modificaciones afectan a la semivida del anticuerpo, añaden o eliminan un sitio de glicosilación, mejoran la producción, mejoran la homogeneidad del anticuerpo producto producido en fermentadores a gran escala, etc.

La porción constante completa de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo puede comprender 0-5 sustituciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo natural. En algunas realizaciones, la porción constante de una cadena pesada o ligera contiene 1-3 sustituciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos en una región constante preferiblemente no es con un aminoácido del mismo grupo (es decir, neutro, cargado positivo, cargado negativo, lipófilo).

En una realización preferida, las regiones constantes del anticuerpo son las regiones constantes de un anticuerpo humano. En una realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 61; o SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 63; en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos están preferiblemente en las regiones constantes o en las regiones marco de las regiones variables como se indica en otra parte de la presente memoria.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado. En una realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de

- SEQ ID NO: 99 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 103, 104, 105 o 106 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos;
- SEQ ID NO: 100 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 103, 104, 105 o 106 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos;
- SEQ ID NO: 101 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 103, 104, 105 o 106 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; o

SEQ ID NO: 102 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 103, 104, 105 o 106 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, no están en las CDR.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende las secuencias de aminoácidos de

- SEQ ID NO: 115 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 119, 120, 121 o 122 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos;
- SEQ ID NO: 116 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 119, 120, 121 o 122 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos;

SEQ ID NO: 117 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 119, 120, 121 o 122 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos; o

SEQ ID NO: 118 y una de la secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 119, 120, 121 o 122 en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 0-5 y cuando están sustituidas preferiblemente 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos, si las hubiera, no están en las CDR. Las sustituciones de aminoácidos están preferiblemente en las regiones constantes o en las regiones marco de las regiones variables como se indica en otra parte de la presente memoria.

La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de (b) SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 122;

SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 122;

SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 122;

SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 121; o SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 122; o las secuencias de aminoácidos especificadas en (b) pero en donde una o

ambas de dichas secuencias comprenden 1-5 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos (si las hubiera) no están en las CDR.

5 Un anticuerpo de la invención es preferiblemente una IgG1 o IgG2a murina, una IgG1 humana mutada en la región constante para reducir o prevenir la activación del complemento o las interacciones del receptor Fc, o una IgG4 humana, o una IgG4 humana mutada para evitar el intercambio de semimoléculas con otras moléculas de IgG4 y/o mutadas en la región constante para reducir o prevenir las interacciones del receptor Fc.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende dos regiones constantes de cadena pesada no idénticas y/o regiones constantes de cadena ligera no idénticas. Típicamente, aunque no necesariamente, las regiones constantes no idénticas difieren entre sí en no más de 5, preferiblemente no más de 1-3 posiciones de aminoácidos. Esta propiedad se utiliza en el campo para producir, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos y/o para proporcionar propiedades adicionales al anticuerpo.

15 Las regiones constantes de un anticuerpo de la invención son preferiblemente regiones constantes humanas, preferiblemente de un anticuerpo humano natural.

20 La invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión o un anticuerpo según la invención. La invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica una CDR de la invención. Preferiblemente que codifica todas las CDR de una cadena ligera variable o pesada variable del anticuerpo 5F2.4. El ácido nucleico comprende preferiblemente la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 111; SEQ ID NO: 112; SEQ ID NO: 113; o SEQ ID NO: 114. La molécula de ácido nucleico se puede utilizar para producir una molécula de unión de la invención. Las líneas celulares provistas del ácido nucleico pueden producir la molécula/anticuerpo de unión en el laboratorio o planta de producción. Alternativamente, el ácido nucleico se transfiere a una célula en el cuerpo de un animal que lo necesita y la molécula/anticuerpo de unión es producida *in vivo* por la célula transformada. La molécula de ácido nucleico de la invención se proporciona típicamente con secuencias reguladoras para expresar la molécula de unión en la célula. Sin embargo, las técnicas de recombinación homólogas actuales se han vuelto mucho más eficaces. Estas técnicas implican, por ejemplo, recombinación homóloga asistida por rotura de doble hebra, utilizando nucleasas inductoras de rotura de doble hebra específicas del sitio tales como TALEN. Tales sistemas de recombinación homóloga o análogos pueden insertar la molécula de ácido nucleico en una región que proporciona una o más de las secuencias reguladoras *en cis* requeridas.

35 La invención proporciona adicionalmente un vehículo o vector de suministro de genes que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. El vehículo o vector de suministro de genes puede ser un plásmido u otro ácido nucleico replicado bacterianamente. Tal vehículo o vector de suministro de genes se puede transferir fácilmente a, por ejemplo, células productoras. El vehículo de suministro de genes también puede ser un vector viral. Los vectores virales preferidos son vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores virales adenoasociados y vectores retrovirales.

45 La invención proporciona adicionalmente una célula aislada o recombinante, o una célula de cultivo celular *in vitro* que comprende una molécula de ácido nucleico o vector de acuerdo con la invención. La invención proporciona adicionalmente una célula aislada o recombinante, o una célula de cultivo celular *in vitro* que comprende una molécula de unión y preferiblemente un anticuerpo según la invención. Preferiblemente, dicha célula produce dicha molécula de unión o anticuerpo. En una realización preferida, dicha célula es una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula NS0 o una célula PER-C6™. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO. Adicionalmente se proporciona un cultivo celular que comprende una célula según la invención. Varias instituciones y compañías han desarrollado líneas celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo, para uso clínico. Los ejemplos no limitantes de tales líneas celulares son células CHO, células NS0 o células PER.C6™. Estas células también se utilizan para otros fines, tales como la producción de proteínas. Las líneas celulares desarrolladas para la producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan en la presente memoria líneas celulares industriales. La invención proporciona una línea celular industrial que comprende una molécula de ácido nucleico, una molécula de unión y/o anticuerpo de acuerdo con la invención. La invención también proporciona una línea celular desarrollada para la producción a gran escala de proteínas y/o anticuerpos que comprende una molécula de unión o anticuerpo de la invención. La invención también proporciona el uso de una línea celular desarrollada para la producción a gran escala de una molécula de unión y/o anticuerpo de la invención.

60 La invención proporciona adicionalmente un método para producir una molécula de unión o un anticuerpo de la invención que comprende cultivar una célula de la invención y recoger dicho anticuerpo de dicho cultivo. Preferiblemente, dicha célula se cultiva en un medio sin suero. Preferiblemente, dicha célula está adaptada para el crecimiento en suspensión. Adicionalmente se proporciona un anticuerpo que se puede obtener mediante un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se purifica preferiblemente del medio del



cultivo. Preferiblemente dicho anticuerpo es purificado por afinidad.

Una célula de la invención es, por ejemplo, una línea celular de hibridoma, una célula CHO, una célula NS0 u otro tipo celular conocido por su idoneidad para la producción de anticuerpos con fines clínicos. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula humana. Preferiblemente una célula que es transformada por una región E1 de adenovirus o un equivalente funcional de la misma. Un ejemplo preferido de dicha línea celular es la línea celular PER.C6™ o equivalente de la misma. En una realización particularmente preferida, dicha célula es una célula CHO o una variante de la misma. Preferiblemente, una variante que utiliza un sistema de vector de glutamina sintetasa (GS) para la expresión de un anticuerpo.

La invención proporciona adicionalmente un método para producir una molécula de unión caracterizada porque se produce una molécula de unión según la invención o un anticuerpo según la invención. Preferiblemente, el método comprende adicionalmente recoger dicha molécula de unión y/o dicho anticuerpo.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de unión o anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un individuo que padece una actividad del complemento excesiva o demasiado activa. El tratamiento da como resultado el alivio de al menos uno de los síntomas asociados con la actividad del complemento excesiva o demasiado activa en dicho individuo.

Cuando se utiliza en la presente memoria, el término "individuo" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero. En una realización preferida, el individuo es un primate, más preferiblemente el individuo es un ser humano.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de unión o anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un individuo que padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neuroinflamatoria o una lesión por isquemia-reperfusión (I/R). El tratamiento da como resultado el alivio de al menos uno de los síntomas asociados con la inflamación, la enfermedad neuroinflamatoria o la lesión por isquemia-reperfusión, tal como disfunción renal o miocárdica, crisis hemolítica y debilidad muscular.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de unión o anticuerpo de acuerdo con el uso de acuerdo con la invención, en donde dicho individuo sufre una inflamación mediada por anticuerpos o una lesión por isquemia-reperfusión tal como infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, sepsis, enfermedades del complejo inmunitario como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, traumatismo múltiple, neuropatía motora multifocal, rechazo de un aloinjerto renal mediado por anticuerpos, anemia hemolítica (auto)inmunitaria, derivación cardiopulmonar y otra cirugía vascular, nefropatía membranosa idiopática, síndrome de Goodpasture y otros.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión de acuerdo con la invención o un anticuerpo de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

#### **Descripción detallada de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y otro aspectos o realizaciones cualesquiera establecidas en la presente memoria tienen solo fines informativos.

El segundo componente del complemento humano (C2) es una glicoproteína de 90-100 kDa que participa en las vías clásica y de las lectinas de activación del complemento. C2 puede ser activado por C1s de la vía clásica o por MASP2 activado de la vía de las lectinas. C2 se une a C4b unida a la superficie (en presencia de Mg<sup>2+</sup>) para formar un complejo C4bC2, que a continuación es escindido por C1s o MASP2 activado en dos fragmentos: un fragmento C2a más grande de 70 kDa, que permanece unido a C4b para formar una C3-convertasa C4bC2a, y un fragmento C2b N-terminal más pequeño de 30 kDa, que se libera en la fase fluida. Una vez activado y unido a C4b, C2a constituye la subunidad catalítica de las convertasas C3/C5 capaces de escindir C3 y C5, respectivamente.

Como muchas otras proteínas plasmáticas, C2 tiene una estructura modular. Partiendo de su extremo N-terminal, C2 consta de tres módulos de proteína de control del complemento (CCP1-3) (también conocidos como repeticiones consenso cortas (SCR) o repeticiones del dominio sushi), un dominio de factor de von Willebrand tipo A (vWFA) que contiene un sitio de adherencia dependiente de iones metálicos y un dominio serina proteasa (SP) Arlaud et al., *Adv Immunol* 1998, 69: 249). Los estudios de microscopía electrónica revelaron que C2 consta de tres dominios. Los tres módulos CCP (CCP1-3) juntos forman el dominio N-terminal, que corresponde a C2b. El dominio vWFA constituye el segundo dominio y el dominio SP constituye el tercer dominio. Los dominios segundo y tercero juntos constituyen la porción C2a más grande de la molécula.

Los módulos CCP son motivos estructurales comunes que se producen en varias proteínas. Estas unidades globulares consisten en aproximadamente 60 residuos de aminoácidos y se pliegan en una estructura de lámina  $\beta$  compacta de seis a ocho cadenas construida alrededor de cuatro residuos de cisteína unidos por disulfuro invariantes (Norman et al., *J Mol Biol* 1991, 219: 717). Los módulos CCP vecinos están anclados covalentemente por

conectores escasamente conservados.

La unión inicial de C2 a C4b unida a la superficie está mediada por dos sitios de baja afinidad, uno sobre C2b (Xu y Volanakis, J Immunol 1997, 158: 5958) y el otro sobre el dominio vWFA de C2a (Horiuchi et al., J Immunol 1991, 47: 584). Aunque la estructura cristalina de C2b y C2a se ha determinado a una resolución de 1,8 Å (Milder et al., Structure 2006, 14: 1587; Krishnan et al., J Mol Biol 2007, 367: 224; Krishnan et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2009, D65: 266), se desconoce la topología exacta y la estructura de los residuos de aminoácidos que constituyen los sitios de contacto para C4 y C3 sobre C2. Por lo tanto, quedan por establecerse los residuos de aminoácidos de C2 involucrados en la interacción con C4 (Krishnan et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2009, D65: 266).

Un anticuerpo monoclonal, 3A3.3 contra un epítipo ubicado sobre C2b, inhibió la unión de C2 a C4b (Oglesby et al., J Immunol 1988, 2: 926), lo que indica la presencia de uno o más sitios de unión a C4b sobre C2b. Los MAb contra la porción C2a de C2 que inhiben la actividad de C2 se han descrito en el documento US2011/0165169A1. No se ha informado sobre las secuencias de aminoácidos de los epítopos para estos mAb en el dominio público. Por lo tanto, quedan por identificar las secuencias de aminoácidos de C2 humano implicadas en la unión de C2 a C4b.

La presente invención describe moléculas de unión capaces de inhibir la activación del complemento a través de la vía clásica y/o la vía de las lectinas mediante el bloqueo de la actividad de C2. Dichas moléculas de unión son preferiblemente mAb humanos o humanizados o fragmentos de unión de los mismos que se unen específicamente a epítopos específicos sobre C2. En una realización preferida, el epítipo es un epítipo funcional. Una molécula de unión de la invención evita la generación de C3a, C3b y otros productos de activación del complemento aguas abajo de C2. Una molécula de unión de la invención inhibe la formación del complejo de complemento de ataque de membrana inducido por anticuerpos, y de ese modo protege las células sensibilizadas con estos anticuerpos del daño mediado por el complemento, tal como la lisis. Por lo tanto, una molécula de unión de la invención es adecuada para tratar individuos en los que necesita ser contrarrestado un efecto mediado por la activación del complemento de un anticuerpo administrado, o un autoanticuerpo. Un autoanticuerpo en este contexto es un anticuerpo generado y producido por el propio individuo.

Una molécula de unión de la invención inhibe la activación de la vía clásica por (auto)anticuerpos en al menos 50%. Preferiblemente, la activación de la vía clásica se inhibe en 70%, más preferiblemente en 90%, más preferiblemente en al menos 95%. Para el cálculo de la actividad de la vía clásica, se hace referencia a los ensayos de actividad complementaria como describen Palarasay et al., en Clin Exp Immunol 2011, 164: 388 o para mediciones como la determinación del título de CH50. La actividad de la vía clásica en ausencia de una molécula de unión de la invención se establece arbitrariamente en 100%.

Una molécula de unión de la invención inhibe la activación del complemento por CRP u otras moléculas que reconocen los patrones moleculares asociados al daño en al menos un 50%. Preferiblemente, la activación de la vía de las lectinas se inhibe en 70%, más preferiblemente en 90%, más preferiblemente en al menos 95%. Para el cálculo de la actividad de la vía de las lectinas, se hace referencia a Palarasay et al., Clin Exp Immunol 2011, 164: 388. La actividad de la vía de las lectinas en ausencia de una molécula de unión de la invención se establece arbitrariamente en 100%.

Una molécula de unión de la invención no inhibe significativamente la activación de la vía alternativa de activación del complemento. Para el cálculo de la actividad de la vía alternativa, se hace referencia a un ensayo de actividad como describen Palarasay et al., en Clin Exp Immunol 2011, 164: 388 o para la determinación de la actividad AP50. La actividad de la vía alternativa en ausencia de una molécula de unión de la invención se establece arbitrariamente en 100%. Una molécula de unión a C2 no inhibe significativamente o no inhibe esencialmente la vía alternativa si la actividad de la vía se reduce en no más de 20% en presencia de cantidades saturantes de la molécula de unión.

Ahora que la invención ha mostrado las propiedades ventajosas de una molécula de unión de la invención, es posible que un experto en la técnica desarrolle otras moléculas de unión que se unan al mismo epítipo. Por lo tanto, en la presente memoria se describe una molécula de unión que se une a C2 y que bloquea la unión de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 resp.; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 96 resp.; SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 resp.; SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 resp.; SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 resp.; SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 27 resp.; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35 resp.; o SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 35 resp. Adicionalmente se describe el uso de una molécula de unión de la invención, preferiblemente un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 resp.; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 96 resp.; SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 resp.; SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 resp.; SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 resp.; SEQ ID NO: 97 y SEQ ID NO: 27 resp.; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35 resp.; o SEQ ID NO: 98 y SEQ ID NO: 35 resp. para identificar una molécula de unión en una colección de moléculas de unión. Una molécula de unión identificada se caracteriza preferiblemente porque la

secuencia se determina de la molécula de unión y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de unión. Esto permite, entre otros, la producción y el uso posterior de la molécula de unión.

5 También se describe en la presente memoria un método para identificar una molécula de unión que comprende la etapa de probar la capacidad de una molécula de unión de prueba que comprende una región variable de cadena pesada y una cadena ligera para unirse a C2 en presencia y ausencia de una molécula de unión conocida de la invención. Se identifica una molécula de unión de prueba cuando la molécula de unión de prueba se une a C2 en ausencia de la molécula de unión conocida de la invención y se une al menos 50% o menos a C2 cuando C2 se incubaba previamente con la molécula de unión conocida de la invención.

10 La invención proporciona una molécula de unión que se une a C2 y que se une a C2b individualmente. Para el propósito de esta realización, se considera que una fracción de tamaño por electroforesis en gel de C2 digerido con C1s hace que los dos fragmentos estén suficientemente separados entre sí para considerar las bandas en la calle, representaciones individuales de los fragmentos C2a y C2b.

15 Una molécula de unión y preferiblemente un anticuerpo monoclonal bi-valente de la invención se une a C2 con una constante de disociación ( $K_D$ ) de menos de  $10e-7$  M, preferiblemente menos de  $10e-8$  M, preferiblemente menos de  $10e-9$  M, más preferiblemente menos de  $10e-10$  M y más preferiblemente menos de  $10e-11$  M.

20 Se puede utilizar una molécula de unión de la invención para inhibir la activación de las vías clásica y/o de las lectinas. Esto a su vez inhibe la generación de péptidos derivados del complemento biológicamente activos como C4a y C4b, C3a, C3b, C5a y otros en plasma o el cuerpo de un sistema funcional individual o de otro tipo. La molécula de unión evita al menos en parte los efectos dañinos de estos péptidos derivados del complemento sobre las células y los tejidos. Se puede utilizar una molécula de unión de la presente invención para la preparación de un medicamento para atenuar los signos y síntomas clínicos de enfermedades humanas al inhibir la activación del complemento in vivo. Las moléculas de los mAb se pueden utilizar solas o combinadas con otro fármaco para el tratamiento de enfermedades o síntomas mediados por el complemento.

25 Las enfermedades que se pueden tratar o prevenir mediante un método o molécula de unión de la invención son preferiblemente enfermedades autoinmunitarias tales como neuritis alérgica experimental, artritis inducida por colágeno tipo II, miastenia grave, anemia hemolítica, glomerulonefritis, nefropatía membranosa idiopática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, vasculitis inducida por complejos inmunitarios, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, accidente cerebrovascular, xenotrasplante, esclerosis múltiple, lesiones por quemaduras, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, trastornos inflamatorios, que incluyen sepsis y choque séptico, toxicidad inducida por la administración in vivo de citocinas o mAb, rechazo mediado por anticuerpos de aloinjertos tales como aloinjertos de riñón, trauma múltiple, lesiones por isquemia-reperusión, infarto de miocardio.

30 Los individuos que padecen una enfermedad que implica un daño mediado por el complemento o en riesgo de desarrollar dicho daño mediado por el complemento se pueden tratar administrando una molécula de unión de la invención a un individuo que lo necesite. De este modo, los péptidos derivados del complemento biológicamente activos se reducen en el individuo y se atenúan o previenen los efectos líticos y otros efectos dañinos del complemento sobre las células y los tejidos. Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de molécula de unión de la invención que es capaz de inhibir la activación del complemento en el individuo.

35 45 El tratamiento (profiláctico o terapéutico) generalmente consistirá en administrar la molécula de unión de la invención por vía parenteral junto con un portador farmacéutico, preferiblemente por vía intravenosa o subcutánea. La dosis y el régimen de administración de la molécula de unión de la invención dependerán del grado de inhibición de la activación del complemento que se tenga por objeto. Típicamente, para las moléculas de unión de la invención que son anticuerpos, la cantidad estará en el intervalo de 2 a 20 mg por kg de peso corporal. Para la administración parenteral, la molécula de unión se formulará en forma inyectable combinada con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen solución salina, solución de dextrosa, solución de Ringer y soluciones que contienen pequeñas cantidades de albúmina de suero humano.

50 55 Típicamente, la molécula de unión de la invención se formulará a una concentración de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 100 mg por ml. En una realización de esta invención, la molécula de unión se administra por medio de inyección intravenosa.

60 Se debe entender que se pretende que estén dentro del alcance de esta invención virtualmente todos los métodos de administración de los mAb o fragmentos de los mismos como se describe en la presente invención, para producir niveles suficientemente altos en la circulación o localmente.

Una composición farmacéutica de la invención se puede formular con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales

tales como las descritas en (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995).

5 El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a portadores o excipientes, que son inherentemente no tóxicos. Los ejemplos de tales excipientes son, pero no se limitan a, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. También se pueden utilizar excipientes no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo.

10 La composición farmacéutica se administra preferiblemente por vía parenteral, preferiblemente por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

15 Las frases "administración parenteral" y "administrada parenteralmente", como se emplea en la presente memoria, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

20 Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos.

30 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio. También se pueden incluir antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

40 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el mAb en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej. como se enumeró anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración mediante esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos, p. ej. de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y secado mediante congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

50 La absorción prolongada de los mAb anti-C2 inyectables o fragmentos de los mismos se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

55 Los mAb de los fragmentos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación

terapéutica.

Los niveles de dosificación reales de los mAb o fragmentos de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente concreto sin ser tóxico para el paciente.

En una realización, las moléculas de unión, en particular los anticuerpos, de acuerdo con la invención se pueden administrar por infusión a una dosis semanal de 10 a 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de 200 a 400 mg/m<sup>2</sup>. Tal administración se puede repetir, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En otra realización más, los mAb o fragmentos de los mismos o cualquier otra molécula de unión descrita en esta invención, se pueden administrar mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

La presente invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que exponen realizaciones particularmente ventajosas. Sin embargo, se debe observar que estas realizaciones son ilustrativas y no se debe interpretar que son restrictivas de la invención de ninguna manera.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1. PAGE-SDS no reductora de C2 humano recombinante de tipo salvaje (calle 1) y desglicosilado (calle 2), C2 escindido por C1s (calle 3) y C2 escindido por C1s desglicosilado (calle 4). La escisión con C1s se realizó a una razón de C1s a C2 de 1:25. C2 no tratado y tratado se visualizó con azul brillante de Coomassie. La identidad de C2 glicosilado ( $\approx$  100 kDa), C2a glicosilado ( $\approx$  70 kDa) y C2b glicosilado ( $\approx$  30 kDa) se indica con puntas de flecha. También se muestra la posición de los marcadores de MW. \* indica enzima PNGasa.

Figura 2. Principio del ELISA para detectar la actividad inhibidora de los mAb anti-C2. Obsérvese que un mAb inhibidor no tendrá efecto sobre la unión de C4 y disminuirá la unión de C3 a la IgG agregada en la fase sólida.

Figura 3. Ejemplo de resultados de detección de actividad inhibidora de sobrenadantes de hibridoma anti-C2. El control positivo es suero diluido sin sobrenadante de hibridoma. El control negativo es suero diluido con EDTA y sin sobrenadante de hibridoma. Los números en el eje X se refieren al número de hibridoma. Las flechas indican sobrenadantes de hibridoma que fueron negativos en el ELISA anti-C2 y que se probaron como controles.

Figura 4. Unión de anticuerpos de ratón anti-C2 del complemento humano contra C2 del complemento humano recombinante a un recubrimiento bajo (25 ng/pocillo; símbolos grises) o alto (200 ng/pocillo; símbolos de color negro). Los resultados (absorción a 450 nm) son medias  $\pm$  DT, n = 2.

Figura 5. Unión de los mAb de ratón anti-C2 a C2 de tipo salvaje (A) o humano recombinante escindido por C1s (B). Las mezclas de proteínas se aplicaron como recubrimiento sobre placas ELISA y se incubaron con diversas concentraciones de mAb anti-C2. Los resultados (absorción a 450 nm) son las medias  $\pm$  DT, n = 2.

Figura 6. Inhibición de la fijación de C3 a IgG agregada en fase sólida mediante los mAb anti-C2 de ratón purificados. Se incubó un volumen de suero humano de nueva aportación con un volumen de mAb a la concentración indicada, diluida y se probada. Las líneas punteadas indican el nivel de fijación en ausencia de un mAb (línea superior) y en presencia de EDTA (línea inferior).

Figura 7. Efecto de los mAb anti-C2 sobre la activación de C3 por IgG agregada en suero humano. Se mezcló un volumen de suero con un volumen de mAb (0,48 mg/ml) y se incubó con IgG agregada a 1 mg por ml. El C3 activado se midió con ELISA como se describe en los métodos. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) por ml.

Figura 8. Efecto de los mAb anti-C2 sobre la citotoxicidad dependiente del complemento de anticuerpos anti-HLA en un modelo humano ex vivo para rechazo de aloinjerto. Se incubó 1  $\mu$ l de suero con anticuerpos anti-HLA con 1  $\mu$ l de suspensión de PBMC ( $2-5 \times 10^6$  células/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Mientras tanto, se incubaron 5  $\mu$ l de suero normal de nueva aportación con 15  $\mu$ l de VB y 5  $\mu$ l de VB que contenía mAb anti-C2 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron 10  $\mu$ l de cada muestra con las mezclas de PBMC durante dos horas a temperatura ambiente. La citotoxicidad se midió con Fluoroquench y se evaluó mediante microscopía. Una puntuación de citotoxicidad de "0" significa que no hay lisis de las células, mientras que se dio una puntuación de 8 cuando >80% de las células se lisaron. Se utilizó suero de nueva aportación sin mAb anti-C2 como control positivo, EDTA como control negativo. El MAb 5F2.4 no se muestra en esta figura, aunque también tiene un efecto inhibidor en este ensayo. El MAb anti-C2 79 también reduce la citotoxicidad en este ensayo pero no tiene efecto inhibidor en otros ensayos.

Figura 9. Ubicación de epítomos sobre C2a o C2b reconocidos por mAb anti-C2 utilizando transferencia Western de C2 humano recombinante de tipo salvaje y escindido por C1s. La identidad de C2 ( $\approx$  100 kDa), C2a ( $\approx$  70 kDa) y C2b ( $\approx$  30 kDa) se indica con puntas de flecha. La detección se realizó con 100 ng/ml (anti-C2 5F2.4 y 35) o 200 ng/ml (anti-C2 13, 32 y 60) de los mAb anti-C2.

Figura 10. Unión de los mAb anti-C2 a C2a humano recombinante purificado con cromatografía de exclusión por tamaño (A), y unión de mAb anti-C2 5F2.4 a C2 humano recombinante desglucosilado (no desnaturalizado/no reducido) (B), a C2 humano recombinante desnaturalizado (no reducido) o reducido (desnaturalizado) (C) como se evaluó en un ELISA. Los resultados (absorción a 450 nm) son las medias  $\pm$  DT, n = 2.

Figura 11. Los mAb anti-C2 inhibidores evitan la escisión de C2 durante la activación del complemento. Se incubaron 10  $\mu$ l de suero con 10  $\mu$ l de mAb anti-C2 (0,48 mg/ml) con 10  $\mu$ l de IgG agregada (1 mg/ml) y se separaron en SDS-PAGE al 7,5%. Las muestras se transfirieron e incubaron con anti-C2 5F2.4 biotinilado (se une a C2 nativo y a C2b) para evaluar la escisión de C2. Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (M). Las flechas indican las posiciones de C2 y C2b visualizadas mediante mAb anti-C2 5F2.4. C indica suero incubado con IgG agregada sin anti-C2 añadido. IgG indica suero incubado con IgG agregada en presencia de IgG policlonal humana (0,48 mg/ml).

Figura 12. Los mAb anti-2 inhibidores no evitan la escisión de C2 humano recombinante de tipo salvaje de la fase fluida por C1s. C2 se incubó con C1s en presencia de los mAb anti-C2. Las mezclas se analizaron con SDS-PAGE no reductora y se visualizaron con azul brillante de Coomassie. La identidad de IgG de ratón ( $\approx$  150 kDa), C2 ( $\approx$  100 kDa), C2a ( $\approx$  70 kDa) y C2b ( $\approx$  30 kDa) se indica con puntas de flecha.

Figura 13. Unión de anticuerpos quiméricos de ratón-humano anti-C2 del complemento humano contra complemento humano recombinante C2 con un recubrimiento bajo (25 ng/pocillo; símbolos de color gris) o alto (200 ng/pocillo; símbolos de color negro). Los resultados (absorción a 450 nm) son medias  $\pm$  DT, n = 2.

Figura 14. Efecto de los mAb IgG4 quiméricos de ratón-humano anti-C2 sobre la activación de C3 por IgG agregada a suero humano. El diseño experimental es el mismo que en la Figura 6, excepto que el formato IgG4 recombinante de ratón-humano de los mAb anti-C2 se añadió al suero humano en lugar del formato murino de los mAb. Anti-C2 63 es un mAb murino no inhibidor contra C2 humano que se probó como control. El mAb de control es un mAb contra el factor XI humano. La IgG de control es IgG humana probada como control.

Figura 15. Efecto de los mAb IgG4 quiméricos de ratón-humano anti-C2 sobre la citotoxicidad dependiente del complemento de anticuerpos anti-HLA en un modelo humano ex vivo para rechazo de aloinjerto. El diseño experimental es el mismo que en la Figura 8, excepto que el formato de IgG4 recombinante de ratón-humano de los mAb anti-C2 se añadió al suero humano en lugar del formato murino de los mAb. La citotoxicidad se analizó con el programa "Leica Q WIN" y se expresó como % de lisis. Anti-C2 63 es un mAb murino no inhibidor contra C2 humano que se probó como control. El mAb de Control es un mAb contra el factor XI humano. Control IgG es IgG humana probada como control.

Figura 16. Lista de secuencias.

Figura 17. Unión de anticuerpos anti-C2 humanizados del complemento humano contra el complemento C2 humano recombinante mediante ELISA. Los resultados (absorción a 450 nm) son medias  $\pm$  DT, n = 2.

Figura 18. Efecto de los mAb anti-C2 humanizados sobre la citotoxicidad dependiente del complemento del anticuerpo anti-HLA-A,B,C humano (clon: W6/32) en un modelo humano ex vivo para rechazo de aloinjerto. Se incubó 1  $\mu$ l de solución de anticuerpo W6/32 (31,25  $\mu$ g/ml) con 1  $\mu$ l de suspensión de PBMC ( $5 \times 10^6$  células/ml) durante 30 minutos a 37°C. Mientras tanto, se incubaron 10  $\mu$ l de suero normal de nueva aportación con 10  $\mu$ l de VB que contenía mAb anti-C2 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron 5  $\mu$ l de cada muestra con las mezclas de PBMC 1 hora a 37°C. Se añadieron 5  $\mu$ l de Fluoroquench a cada pocillo, y las muestras se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, la citotoxicidad se midió mediante microscopía automatizada (Leica Micro Systems). El porcentaje de lisis fue calculado mediante el soporte lógico Leica Q WIN. Se utilizó suero de nueva aportación sin mAb anti-C2 como control positivo, EDTA y EGTA como controles negativos. Los controles adicionales fueron un mAb IgG4 humano irrelevante y suero con deficiencia de C2. Los resultados son la media  $\pm$  SEM, n = 2.

Figura 19. Efecto de los mAb anti-C2 humanizados sobre la citotoxicidad dependiente del complemento de anticuerpos anti-HLA en suero en un modelo humano ex vivo para rechazo de aloinjerto. Se incubó 1  $\mu$ l de anticuerpos anti-HLA en suero con 1  $\mu$ l de suspensión de PBMC ( $5 \times 10^6$  células/ml) durante 30 minutos a 37°C. Mientras tanto, se incubaron 10  $\mu$ l de suero normal de nueva aportación con 10  $\mu$ l de VB que contenía mAb anti-C2 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron 5  $\mu$ l de cada muestra con las mezclas de PBMC 1 hora a 37°C. Se añadieron 5  $\mu$ l de Fluoroquench a cada pocillo, y las muestras se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, la citotoxicidad se midió por microscopía automatizada (Leica Micro Systems). El porcentaje de lisis fue calculado por medio del soporte lógico Leica Q WIN. Se utilizó suero de nueva aportación sin mAb anti-C2 como control positivo, EDTA como control negativo. Los resultados son la media  $\pm$  DT, n = 2.

## Ejemplos

### 60 Materiales:

La IgG agregada (aggIgG) se preparó calentando IgG humana purificada (Gammaquin, Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) a 80 mg por ml en PBS durante 20 minutos a 63°C. La preparación se diluyó a 10 mg por ml y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Se obtuvo suero humano de nueva aportación de voluntarios humanos por punción venosa y se almacenó en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se preparó suero envejecido normal incubando suero de nueva aportación normal durante una semana a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se adquirió suero con deficiencia de C2 de Sigma-Aldrich.

5 Los anticuerpos policlonales anti-C3 de pollo purificados por afinidad y los anticuerpos anti-C4 de cabra se adquirieron en Mybiosource.com y Thermo Scientific, respectivamente. Los anticuerpos se biotinilaron utilizando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) según el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadió un exceso de biotina 20 M al anticuerpo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el anticuerpo se sometió a diálisis durante la noche contra PBS y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

10 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de sangre heparinizada mediante centrifugación Ficoll-Paque (densidad de flotación 1,077 g/ml; GE Healthcare). Las células aisladas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente y se mantuvieron en medio RPMI a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

15 **Ejemplo 1: Generación de anticuerpos de ratón anti-C2 del complemento humano**

**(a). Generación de complemento C2 humano recombinante**

20 La proteína C2 del complemento humano recombinante con una etiqueta His N-terminal fue generada por U-Protein Express, Utrecht, Países Bajos. Brevemente, se clonó el ADNc que codifica la proteína C2 del complemento humano (secuencia GenBank: NM\_000063; véase SEQ ID NO.1), y posteriormente se expresó en células HEK293. El C2 se purificó por cromatografía de afinidad y se analizó con SDS-PAGE utilizando el sistema de gel prefabricado NuPage® Novex® (Invitrogen). Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

25 Como se muestra en la figura 1 (calle 1), la preparación de C2 mostró una pureza  $>95\%$ , es decir, se observó una banda con una masa molecular de  $\approx 100$  kDa, compatible con la masa pronosticada de C2 humano glicosilado.

30 **(b). Caracterización bioquímica del complemento C2 humano recombinante**

Se generaron C2a y C2b recombinantes por incubación de C2 (100  $\mu\text{L}$  de una solución de 400  $\mu\text{g/ml}$ ) con C1s activados derivados de plasma (100  $\mu\text{L}$  de una solución de 16  $\mu\text{g/ml}$ ; Calbiochem) durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en PBS (razón C1s-C2 de 1:25). Para determinar la presencia de glicanos ligados a N sobre C2, se trataron 1,8  $\mu\text{g}$  de C2 recombinante sin escindir o escindido por C1s con péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F; New England Biolabs) durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en tampón de reacción de acuerdo con instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando el sistema de gel prefabricado NuPage® Novex® (Invitrogen) y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

40 Como se muestra en la figura 1 (calle 1 frente a calle 3), C1s escindió C2 recombinante en los subcomponentes C2a (70 kDa) y C2b ( $\approx 30$  kDa), de acuerdo con la masa pronosticada de C2a y C2b, respectivamente. El C2 recombinante de tipo salvaje, y los C2a y C2b recombinantes escindidos con C1s, portaban glicanos ligados a N, que era evidente a partir de las masas moleculares aparentes más bajas después de la incubación con PNGasa F (véanse la calle 1 frente a la calle 2 y la calle 3 frente a la calle 4 en la figura 1). Estos resultados concuerdan con la noción de que C2a y C2b humanos tienen 6 y 2 supuestos sitios de glicosilación ligados a N, respectivamente, (Martini et al., BMC Immunol 2010, 11: 43; Krishnan et al., J Mol Biol 2007, 367: 224; Krishnan et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2009, D65: 266).

45 **(c). Inmunización y generación de anticuerpos contra el complemento C2 humano glicosilado**

50 Según la técnica anterior, los anticuerpos inhibidores contra C2 humano glicosilado solo se pueden obtener mediante inmunización de ratones con C2 humano purificado desglicosilado (Oglesby et al., J Immunol 1988, 2: 926) o con el subcomponente C2a humano purificado (documento US 2001/0026928 A1), y no con C2 humano purificado glicosilado intacto.

55 En contraste con el enfoque de inmunización de Oglesby (véase más arriba; J Immunol 1988, 2: 926), a ratones BALB/c (hembra, 6-8 semanas de edad; Charles River Laboratories) se les inyectaron subcutáneamente  $\approx 500$   $\mu\text{L}$  de complemento C2 humano recombinante glicosilado en coadyuvante completo de Freund (cada ratón con 25  $\mu\text{g}$  de complemento C2 humano recombinante glicosilado en 250  $\mu\text{L}$  de benzamidina HCl 5 mM en PBS (U-Protein Express) mezclado con 250  $\mu\text{L}$  de coadyuvante completo de Freund (Sigma)) el día 0. Las respuestas de anticuerpos en ratones se estimularon mediante inyecciones subcutáneas de C2 recombinante glicosilado en coadyuvante incompleto de Freund (cada ratón con 25  $\mu\text{g}$  de complemento humano recombinante glicosilado C2 en 250  $\mu\text{L}$  de PBS-5 mM de benzamidina HCl mezclado con 250  $\mu\text{L}$  de coadyuvante de Freund incompleto (Sigma) el día 21 y el día 42, e inyecciones intraperitoneales con C2 recombinante glicosilado sin coadyuvante (cada ratón con 25  $\mu\text{g}$  de C2 recombinante en 250  $\mu\text{L}$  de benzamidina HC 5 mM en PBS) el día 63 y el día 64. El día 67, los

esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma SP2/0-Ag14 (DSMZ) utilizando tecnología convencional de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (Nature 1975, 256: 495). Brevemente, se sacrificaron los ratones inmunizados. Los esplenocitos se extrajeron de los bazo y se lavaron en opti-MEM® I sin suero con medio GlutaMax (medio SF; Invitrogen). Las células de mieloma SP2/0-Ag14 con crecimiento logarítmico se lavaron en medio SF y se añadieron a los esplenocitos produciendo una razón 5:1 de células esplenocitos a mieloma. A continuación, se sedimentaron las células y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadió gota a gota 1 ml de una solución al 37% (v/v) de polietilenglicol 4000 (Merck) durante un período de 60 segundos, después de lo cual las células se incubaron durante otros 60 segundos a 37°C. A continuación, se añadieron lentamente 8 ml de medio SF, seguido de 5 ml de opti-MEM® I con GlutaMax/suero de ternera fetal al 10% (v/v) (FCS; Bodinco), con agitación suave. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las células se sedimentaron, se lavaron en opti-MEM® I con GlutaMax/FCS al 10% para eliminar el polietilenglicol residual, y finalmente se colocaron en placas a una concentración de  $10^5$  células/200  $\mu$ l por pocillo en medio de selección de aminopterina, es decir, opti-MEM® I con GlutaMax/FCS al 10% que se complementó con 50x aminopterina Hybri-Max™ (un Inhibidor de la síntesis de ADN *de novo* (Sigma)). A partir del día 7, el medio de selección de aminopterina se repuso cada 2-3 días, y el día 13, el medio de selección de aminopterina se reemplazó por opti-MEM I con GlutaMax/FCS al 10%.

A partir del día 13 después de la fusión, los sobrenadantes de hibridomas se seleccionaron para la producción de anticuerpos anti-C2 utilizando un ELISA con C2 humano recombinante glicosilado (U-Protein Express) aplicado como recubrimiento sobre placas de 96 pocillos. El ELISA de detección se realizó de la siguiente manera. Se utilizó C2 recombinante humano glicosilado para el recubrimiento (250 ng/ml en PBS; 25 ng/100  $\mu$ l/pocillo). Después de un lavado exhaustivo con PBS/Tween 20 al 0,05%, p/v, las placas se bloquearon con PBS/Tween 20 al 0,05%/1%, p/v, albúmina de suero bovino (BSA) (Roche) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, las placas se incubaron con 100  $\mu$ l de sobrenadante de hibridoma no diluido/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 al 0,05%, se determinó la unión de los anticuerpos con anticuerpos de cabra específicos anti-Fcy de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una solución lista para su uso de sustrato TMB (Invitrogen) para la detección colorimétrica. Después de añadir  $H_2SO_4$  1 M, las densidades ópticas se midieron a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia de 655 nm) utilizando un lector de microplacas (BioRad). Los hibridomas positivos en este ELISA se expandieron y se crioconservaron.

Varios experimentos de fusión arrojaron 36 hibridomas que producían anticuerpos contra C2 humano glicosilado, medido con el ELISA de detección que se acaba de describir. Los sobrenadantes de estos hibridomas se analizaron para determinar la actividad inhibidora hacia C2 glicosilado como se describe en los siguientes ejemplos.

### **Ejemplo 2: ELISA para detectar actividad inhibidora de sobrenadantes de hibridoma anti-C2**

Los sobrenadantes de cultivo de los anticuerpos anti-C2 que producen hibridoma se seleccionaron inicialmente para detectar efectos inhibidores sobre C2 en un sistema ELISA (Figura 2). En este ELISA, la IgG humana añadida se revistió sobre placas de microtitulación (Greiner-Bio-One), y a continuación se incubó con suero de nueva aportación diluido o no preincubado con sobrenadante de hibridoma que contiene anti-C2. La fijación de C4 y C3 en la placa, indicativa de la activación del complemento, se midió a continuación con anticuerpos policlonales biotinilados anti-C3 y anti-C4 purificados por afinidad. La unión de anti-C3 y anti-C4 a la placa se midió a continuación con estreptavidina-HRP, que a su vez se visualizó con 3',5'-tetrametilbencidina. Brevemente, las placas ELISA (Greiner-Bio-One) se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l por pocillo de IgG agregada de 10  $\mu$ g/ml en PBS. El volumen final de este y todos los pasos posteriores en el ELISA fue de 100  $\mu$ l. Antes de utilizar las placas se lavaron 5 veces con MilliQ. Las muestras a analizar se prepararon como sigue. El suero humano de nueva aportación se diluyó 1 a 100 en solución salina tamponada con veronal, pH 7,4 (Lonza), que contenía  $MgCl_2$  1 mM,  $CaCl_2$  0,15 mM y Tween 20 al 0,1% (p/v) (VB-T). Se incubó 1 volumen de suero diluido con 1 volumen de sobrenadante de hibridoma y un volumen de VB-T durante 30 minutos a temperatura ambiente. La muestra de control negativo se preparó mezclando 100  $\mu$ l de suero normal de nueva aportación diluido con 100  $\mu$ l de EDTA (0,1 M) y 100  $\mu$ l de VB-T. Como control positivo, la mezcla se preparó con suero diluido y VB-T en lugar de sobrenadante de cultivo. A continuación, se incubaron 100  $\mu$ l de estas mezclas en las placas recubiertas con IgG agregada durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron con anticuerpos biotinilados contra C4 y C3 humanos diluidos 1 a 50 en PBST. Los anticuerpos murinos anti-C4 o anti-C3 unidos se detectaron mediante incubación con 100 estreptavidina-HRP (BioLegend) 1:7500 diluida en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron 5 veces con agua destilada y se desarrollaron con 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (sustrato TMB, Invitrogen). La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  2 M a cada pocillo. La absorbancia de cada pocillo se leyó a 450 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific). Los datos se analizaron con Graphpad Prism 5.

Nueve hibridomas de varios experimentos de fusión mostraron una actividad inhibidora sustancial de la unión de C3, mientras que no afectaron a la fijación de C4 (Figura 3A y B), descartando que su efecto sobre la activación de C3 se debiera a una activación específica y al consumo de complemento durante el procesamiento de las muestras. Los



números de estos hibridomas son: anti-C2 7, anti-C2 13, anti-C2 23, anti-C2 24, anti-C2 26, anti-C2 27, anti-C2 32, anti-C2 5F2 y anti-C2 5G2. Además, se identificaron algunos hibridomas inhibidores límite (hibridoma 19, 35, 60 y 65). La secuenciación de las regiones variables de cadena pesada y ligera reveló que los mAb anti-C2 24 y anti-C2 32 eran idénticos, al igual que los mAb anti-C2 5F4 y anti-C2 5G2.

5 **Ejemplo 3: Caracterización de la unión de anticuerpos anti-C2 murinos purificados 13, 32, 35, 60 y 5F2.4**

**(a). Unión de los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 a C2 humano recombinante glicosilado**

10 Los mAb anti-C2 inhibidores y no inhibidores se purificaron con cromatografía de afinidad con proteína G (GE Healthcare). Las cadenas pesadas y ligeras se tipificaron para la clase de isotipo utilizando el Kit IsoQuick™ para Mouse Monoclonal Isotyping (Sigma) (Tabla 1).

*Tabla 1. Clase de anticuerpos de algunos mAb murinos contra C2 humano*

MAB murino	Inhibición en el ensayo de escrutinio (y/n)	Clase de anticuerpo murino
Anti-C2 7	Y	IgG1κ
Anti-C2 13	Y	IgG1κ
Anti-C2 18	N	IgG1κ
Anti-C2 19	N	IgG1κ
Anti-C2 23	Y	IgG1κ
Anti-C2 24	Y	IgG1κ
Anti-C2 26	Y	IgG1κ
Anti-C2 27	Y	IgG1κ
Anti-C2 31	N	IgG1/M/κ/λ
Anti-C2 32	Y	IgG1κ
Anti-C2 35	S/N	IgG1κ/IgG2bk (señal débil 2b)
Anti-C2 60	S/N	IgG1κ
Anti-C2 63	N	IgG1κ
Anti-C2 79	N	IgG1κ/IgG2bk (señal débil 2b)
Anti-C2 5F2.4	Y	IgG2ak

15 Los mAb anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 purificados se caracterizaron adicionalmente evaluando la unión a altas (200 ng por pocillo) y bajas (25 ng por pocillo) cantidades de C2 recombinante glicosilado (U-protein Express) utilizando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1 (c).

20 Como se muestra en la figura 4, los anticuerpos anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 se unen de forma dependiente de la dosis al complemento C2 humano recombinante glicosilado. La unión de los anticuerpos anti-C2 5F2.4, anti-C2 35 y anti-C2 60 mostró solo ligeras diferencias con respecto a la unión a C2 aplicado como recubrimiento a 25 ng/pocillo y a 200 ng/pocillo, mientras que la unión de los anticuerpos anti-C2 13 y anti-C2 32 disminuyó significativamente a C2 aplicado como recubrimiento a 25 ng/pocillo en comparación con C2 aplicado como recubrimiento a 200 ng/pocillo (Figura 4). Por lo tanto, la afinidad (relativa) de anti-C2 del complemento 13 (mlgG1κ) y anti-C2 32 (mlgG1κ) humano de ratón fue menor que la de los anticuerpos anti-C2 5F2.4 (mlgG2ak), anti-C2 35 (mlgG1κ) y anti-C2 60 (mlgG1κ).

25 **(b). Unión de los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 a C2 humano recombinante glicosilado escindido por C1s**

30 Unión de los mAb anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 purificados a C2 recombinante glicosilado (200 ng por pocillo; U-protein Express) o a C2 recombinante glicosilado escindido por C1s (200 ng por pocillo), se evaluó utilizando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1(c).

35 Los anticuerpos anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 se unieron de forma dependiente a la dosis a C2 recombinante glicosilado (Figura 5A) y a C2 recombinante glicosilado escindido por C1s (Figura 5B). La última observación demostró que los anticuerpos anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 no reconocieron un epítipo sobre el sitio de escisión de C1s (es decir, enlace Arg<sup>243</sup> - | - Lys<sup>244</sup>; <http://www.uniprot.org/uniprot/P09871>) del complemento C2 humano recombinante glicosilado.

**Ejemplo 4: Actividad inhibidora de los mAb murinos anti-C2 purificados sobre la fijación de C3 a IgG agregada en fase sólida**

Para confirmar la actividad inhibidora de los mAb anti-C2, se utilizó el mismo ensayo que el descrito en el Ejemplo 2, excepto que las muestras a analizar se prepararon de manera diferente para mejorar la solidez del ensayo. Las muestras se prepararon mezclando 10 µl de suero de nueva aportación normal con 10 µl del mAb anti-C2 purificado en PBS. La muestra de control positivo se preparó mezclando 10 µl de suero de nueva aportación normal con 10 µl de VB. Como muestra de control negativo, se mezclaron 10 µl de suero de nueva aportación normal con 10 µl de EDTA (0,1 M). Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, todas las muestras se diluyeron de 1 a 100 en PBS/Tween 20 al 0,1% y a continuación se realizó el mismo protocolo de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo anterior. Como se muestra en la Figura 6, ni un mAb de control ni el mAb no inhibidor anti-C2 63 afectaron la fijación de C3 a la IgG en fase sólida. En contraste, los anticuerpos anti-C2 32, 5F2.4 y 13 inhibieron la fijación de C3 a las placas, mientras que los mAb anti-C2 35 y 60 no mostraron actividad significativa en este ensayo.

**Ejemplo 5: Actividad inhibidora de los mAb murinos anti-C2 purificados sobre la activación de C3 en suero de nueva aportación por IgG agregada de la fase fluida**

El efecto de los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2 sobre la activación de C3 de la fase fluida se midió en un ensayo en el que se incubó suero humano de nueva aportación preincubado con mAb anti-C2 con IgG agregada. A continuación, se midió la activación de C3 en las muestras con un ELISA descrito previamente (Wolbink GJ et al., J Immunol Methods 1993, 63: 67). Las muestras se prepararon mezclando 30 µl de suero de nueva aportación normal con 30 µl de VB que contenía el mAb anti-C2 y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 30 µl de IgG agregada (1 mg/ml) en VB a todas las muestras para activar el complemento, excepto a los controles negativos, que se complementaron con 30 µl de VB. Las muestras se incubaron posteriormente durante 30 minutos a 37°C. La activación del complemento se detuvo añadiendo 60 µl de EDTA (0,1 M) a todas las muestras. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, todas las muestras se diluyeron con PBS/Tween 20 al 0,1% complementado con EDTA 10 mM (la dilución final del suero fue de 1 a 4000), y se analizaron en el ELISA para C3 activado. Como control positivo, se preincubó suero humano de nueva aportación con 30 µl de VB que no contenía mAb. Como control negativo, se incubó suero de nueva aportación solo con VB, y no con mAb o IgG agregada. Este control se realizó dos veces, una de las cuales se mantuvo en hielo derretido durante todas las incubaciones. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de C3 activado, que se calcularon en comparación con una curva patrón que consistía en diluciones en serie de suero normal envejecido. Como el ensayo para C3 activado no discrimina entre C3b, C3bi o C3c, C3 activado se denotó como C3b/c. La Figura 7 muestra que tras la adición de IgG agregada al suero humano se generó C3b/c (control positivo en la Figura 7). La adición de IgG (IgG Gamma-Quin en la figura), un mAb de control irrelevante ((anti-FXI) en la Figura 6) o el mAb-63 anti-C2 no inhibidor no tuvo efecto sobre la generación de C3b/c en suero por la IgG agregada. En contraste, los mAb anti-C2 7, 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 inhibieron la generación de C3b/c por la IgG agregada (Figura 7).

**Ejemplo 6: Efectos de los mAb anti-C2 murinos purificados sobre la citotoxicidad de los anticuerpos anti-HLA**

Como modelo ex vivo para el rechazo mediado por anticuerpos de trasplantes humanos, se modificó la prueba de diagnóstico de emparejamiento cruzado que prueba la presencia de anticuerpos dependientes del complemento en receptores de trasplante candidatos. En la prueba normal, las células del donante o las células con las mismas moléculas de HLA que el donante se mezclan con suero inactivado por calor del receptor en presencia de complemento de conejo. En caso de que el receptor tenga anticuerpos contra las moléculas HLA del donante, las células se lisarán. Esto se evalúa con un microscopio y se expresa como una puntuación de citotoxicidad (de 1 - sin lisis - a 8 -> 80% de lisis). Para probar los efectos de los mAb anti-C2, este ensayo se modificó sustituyendo el suero de conejo por suero humano de nueva aportación. Además, se utilizó suero de un paciente con títulos altos de anticuerpos anti-HLA contra múltiples moléculas de HLA.

La prueba de coincidencia cruzada modificada se realizó de la siguiente manera. Los pocillos de una bandeja Terasaki (Greiner) se cargaron con 1 µl de suero altamente inmunizado con anticuerpos HLA y 1 µl de suspensión de PBMC ( $2-5 \times 10^6$  células/ml) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Mientras tanto, las muestras que se debían analizar se prepararon mezclando 5 µl de suero normal de nueva aportación, 15 µl de VB y 5 µl de VB que contenía mAb anti-C2. Se preparó una muestra de control positivo añadiendo 5 µl de suero de nueva aportación normal a 20 µl de tampón veronal sin mAb anti-C2, y se preparó una muestra de control negativo mezclando 5 µl de suero de nueva aportación normal, 15 µl de tampón Veronal y 5 µl de EDTA 100 mM. Posteriormente, todas las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 µl de cada muestra a los pocillos por duplicado y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron cinco µl de Fluoroquench (Sanbio) a los pocillos. Después de 30 minutos, la bandeja Terasaki se leyó utilizando un microscopio automático (Leica) y en algunos experimentos se calculó la lisis celular con un programa

especial llamado "Leica Q WIN", mientras que en otros experimentos un técnico experimentado calificó la lisis. Una puntuación de citotoxicidad de "0" significa que no hay lisis de las células, mientras que se dio una puntuación de 8 cuando > 80% de las células se lisaron.

5 Los anticuerpos anti-C2 se probaron a concentraciones que variaban de 0,6 a 1,5 mg por ml. Los mAb anti-C2 18, 19, 23, 31 y 63 no tuvieron efecto sobre la destrucción dependiente del complemento de las células sensibilizadas con anticuerpos anti-HLA (véase la Figura 8). En contraste, los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60, 7, 24, 79 inhibieron la citotoxicidad dependiente del complemento en este modelo para el rechazo de aloinjerto mediado por anticuerpos.

10 **Ejemplo 7: Caracterización de dominios sobre el complemento C2 humano reconocidos por los anticuerpos anti-C2 del complemento antihumano de ratón 13, 32, 35, 60 y 5F2.4**

15 **(a). Mapeo de epítomos para mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 sobre los subcomponentes humanos recombinantes glicosilados C2a y C2b con transferencia Western**

15 El C2 humano recombinante glicosilado (intervalo 125-500 ng/calle, véase la Figura 9; U-protein Express) o C2 humano recombinante glicosilado escindido por C1s (intervalo 62,5-1000 ng/calle, véase la Figura 9; para el procedimiento de escisión de C2, véase el Ejemplo 1 (b)) se sometieron a electroforesis utilizando geles Tris-Bis al 4-12% y tampón de migración MOPS (Invitrogen) en condiciones no reductoras en SDS-PAGE prefabricado (sistema NuPage® Novex®). A continuación, las proteínas C2 se sometieron a transferencia eléctrica sobre una membrana de transferencia de poli(fluoruro de vinilideno) (PDVF) (Millipore). Después del bloqueo con PBS/Tween 20 al 0,05%/fracción V BSA al 1% (Roche) durante 20 minutos a temperatura ambiente, las membranas PDVF se incubaron con los mAb anti-C2 5F2.4 anti-C2 (100 ng/mL), anti-C2 13 (200 ng/mL), anti-C2 32 (200 ng/mL), anti-C2 35 (100 ng/mL) y anti-C2 60 (200 ng/mL) durante 1 hora a RT. Después de un lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 al 0,05%, se determinó la unión de los mAb anti-C2 con anticuerpos de cabra específicos anti-Fcγ de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) diluidos 1:10.000 durante RT, seguido de una solución lista para su uso de sustrato TMB (Sigma) para la detección colorimétrica.

30 Como se muestra en la figura 9, todos los mAb anti-C2 examinados se unieron a C2 humano recombinante glicosilado no escindido (≈ 100 kDa). Además, mAb anti-C2 5F2.4 y anti-C2 35 reconocieron específicamente el subcomponente glicosilado C2b (≈ 30 kDa), mientras que los mAb anti-C2 13 y anti-C2 32 reconocieron específicamente el subcomponente glicosilado C2a (≈ 70 kDa). El mAb anti-C2 60 parecía unirse a los subcomponentes glicosilados C2a y C2b.

35 **(b). Unión de los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 al subcomponente C2a humano recombinante glicosilado con ELISA**

40 El C2a humano recombinante glicosilado se purificó a partir de C2 escindido por C1s (para el procedimiento de escisión de C2, véase el Ejemplo 1 (b)) mediante cromatografía de exclusión por tamaño (columna Yarra™ 3U sec 2000 300x 4,60). En SDS-PAGE utilizando el sistema de gel prefabricado NuPage® Novex® (Invitrogen), la preparación de C2a fue >95% homogénea (no se muestra). Posteriormente, los mAb anti-C2 purificados se analizaron adicionalmente para determinar la unión a C2a purificado (200 ng por pocillo) utilizando el procedimiento ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 1(c).

45 Como se muestra en la figura 10A, y de acuerdo con los datos de transferencia Western (véase el Ejemplo 7 (a)), los mAb anti-C2 13 y anti-C2 32 demostraron una unión dependiente de la dosis (es decir, saturación a 0,1 μg/mL) a C2a recombinante glicosilado purificado, mientras que los mAb anti-C2 60 mostraron una unión intermedia a C2a, y los mAb anti-C2 5F2.4 y anti-C2 35 apenas se unieron a C2a. Una cantidad traza de C2 recombinante glicosilado no escindido explicó la unión observada de los mAb anti-C2 5F2.4 y anti-C2 35.

50 **(c). Unión de mAb anti-C2 5F2.4 a C2 humano recombinante desglicosilado, desnaturalizado y reducido con ELISA**

55 La desglicosilación de C2 recombinante se realizó utilizando el procedimiento descrito anteriormente en el Ejemplo 1 (b) pero el tampón de reacción no tenía reactivos de desnaturalización/reducción, y el tratamiento con Péptido-N-Glicosidasa F (PNGasa F; New England Biolabs) fue durante la noche a 37°C. La desnaturalización y la reducción de C2 recombinante se llevaron a cabo utilizando NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen) con o sin NuPAGE® Reducing Agent 10X (Invitrogen), respectivamente. Posteriormente, el mAb anti-C2 5F2.4 purificado se analizó adicionalmente para determinar la unión a C2 recombinante no tratado (200 ng por pocillo), C2 recombinante desglicosilado (100 ng por pocillo), C2 recombinante desnaturalizado (200 ng por pocillo) y C2 recombinante reducido (200 ng por pocillo) utilizando el procedimiento ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 1(c).

Como se muestra en la figura 10B, el mAb anti-C2 5F2.4 demostró una unión dependiente de la dosis al C2 recombinante desglicosilado (no desnaturalizado/no reducido). Como se muestra en la figura 10C, el mAb anti-C2

5F2.4 demostró una unión dependiente de la dosis al C2 recombinante desnaturalizado, y no mostró unión al C2 recombinante reducido (desnaturalizado). En resumen (véase la Tabla 2), el mAb anti-C2 5F2.4 parecía reconocer un epítipo sobre el subcomponente C2b de C2 humano y no un epítipo sobre el subcomponente C2a de C2 humano (véanse los Ejemplos 7(a) y 7(b)). La unión del mAb anti-C2 5F2.4 sobre el subcomponente C2b parecía ser insensible a la escisión por C1s (véase el Ejemplo 3(b)), desglucosilación y desnaturalización de C2 humano. Sin embargo, los puentes internos de cisteína parecían ser críticos para la unión de mAb anti-C2 5F2.4 sobre el subcomponente C2b.

Tabla 2. Características de unión de mAb anti-C2-5F2.4

	Diana en ELISA	Unión de 5F2.4
	BSA (583 aa)	-
	C2 (732 aa)	+
	C2 desglucosilado	+
	C2 escindido por C1s	+
	C2a (509 aa)	-
	C2 desnaturalizado	+
	C2 reducido	-

	C2b	C2a
Enlaces S-S intra	6x	2x
Glicanos ligados a N	2x	6x

10 **Ejemplo 8: Los mAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2 inhiben la escisión de C2 en suero humano de nueva aportación por IgG agregada de la fase fluida**

15 Para investigar el mecanismo de inhibición de los mAb anti-C2, se incubaron 10 µl de suero con 10 µl de mAb anti-C2 a 0,48 mg/ml a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 µl de IgG agregada a 1 mg/ml y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 35 µl de agua y 35 µl de tampón de muestra a las muestras, que posteriormente se hirvieron durante 10 minutos. Finalmente, se separaron a continuación 15 µl de la mezcla en SDS-PAGE al 7,5%. Las muestras se transfirieron e incubaron con 5 µg de anti-C2 5F2.4 biotinilado. Como se muestra en el ejemplo anterior, este anticuerpo se une al C2 nativo y a C2b, que tiene un Mr ≈30.000. Por lo tanto, en caso de que el anticuerpo no inhibidor se añada al suero antes de la activación con la IgG agregada, se espera que la mayoría de C2 esté presente en la muestra de suero como C2b (y C2a que no se visualiza en la transferencia) y una minoría como C2 intacto con Mr ≈90.000. De hecho, esto se observó con el control de IgG humana (Figura 11, la calle marcada con IgG), con un mAb de control no dirigido a C2 (calle marcada con C en la Figura 11), y con un mAb C2 no inhibidor (calle marcada con 63 en Figura 11), aunque este mAb mostró una escisión algo menor de C2 en comparación con la observada con los mAb de control no dirigidos a C2, probablemente debido a algún impedimento estérico. Todos los otros mAb disminuyeron la escisión de C2 en suero tras la activación del sistema del complemento con la IgG agregada (Figura 11).

30 **Ejemplo 9: Los MAb anti-C2 13, 32, 35, 60 y 5F2.4 no inhiben la escisión del C2 humano recombinante glicosilado de la fase fluida libre por C1s humano**

35 Para investigar el mecanismo de inhibición de los mAb anti-C2, se preincubó C2 humano recombinante glicosilado con los mAb anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 (a una razón molar de C2 a anticuerpo de 1:2) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Paralelamente, los controles de isotipo de IgG1K e IgG2aK de ratón (ambos de BD Biosciences) se probaron como controles negativos. A continuación, se añadió C1s humano (razón C1s-C2 de 1:25; Calbiochem) durante 1 hora a 37°C. Las mezclas se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando el sistema de gel prefabricado NuPage® Novex® (Invitrogen), y se tiñeron con azul brillante de Coomassie.

Como se muestra en la Figura 12, ninguno de los mAb anti-C2 inhibió la escisión de C2 recombinante por C1s. Además, no se observó ningún efecto sobre la escisión de C2 por C1s (datos no mostrados) cuando se utilizaron concentraciones más altas (a razones molares de C2 a anticuerpo de ≈1:3 a ≈1:7) de mAb anti-C2. En conjunto, estos resultados demostraron que los mAb anti-C2 5F2.4, anti-C2 13, anti-C2 32, anti-C2 35 y anti-C2 60 no reconocieron un epítipo sobre o cerca del sitio de escisión de C1s (es decir, el enlace Arg<sup>243</sup> - | - Lys<sup>244</sup>; <http://www.uniprot.org/uniprot/P09871>).

**Ejemplo 10: Caracterización genética molecular de anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60 de ratón con cebadores degenerados**

Las células de hibridoma se lavaron con PBS y se dividieron en alícuotas en microviales que contenían 5 x 10<sup>6</sup> células, y se almacenan como gránulos a -80°C. Estos gránulos celulares se utilizaron para aislar ARN utilizando el RNeasy Mini Isolation Kit (QIAGEN). Se determinó la concentración de ARN (A260 nm) y el ARN se almacenó a -80°C. Mediante la transcriptasa inversa, el ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN utilizando RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), y se almacenó a -20°C. Basándose en el isotipo de los anticuerpos, se diseñaron los cebadores mostrados en la Tabla 3 para amplificar las regiones V de anti-C2 5F2.4, -13, 32, 35 y 60 humanos de ratón.

Tabla 3. Cebadores de PCR utilizados para clonar ADNc de los mAb anti-C2

región <sup>+</sup>	núm. de cebador*	secuencia del cebador**	dirección	gene
5F2.4 VL	317	CTCTTGTTCCAGGTTCCAC	e	kappa
	4	ACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG	as	kappa cs
5F2.4 VH	1	SAGGTSMARCTGVAGSAGTCWGG	e	IgG FR1
	204	TGGACAGGGATCCAGAGTTC	as	IgG cs
13 VL	213	GCGCTTAACACAAACCCNCCNYT	e	kappa FR1
	4	ACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG	as	kappa cs
13 VH	1	SAGGTSMARCTGVAGSAGTCWGG	e	IgG FR1
	2	AATTTTCTGTCCACYTTGGTGCT	as	IgG cs
32 VL	265	GCGATATACARATGACNCARAC	e	kappa FR1
	4	ACACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG	as	kappa cs
32 VH	1	SAGGTSMARCTGVAGSAGTCWGG	e	IgG FR1
	2	AATTTTCTGTCCACYTTGGTGCT	as	IgG cs
35 VL	201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	as	kappa cs
	201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	as	kappa cs
35 VH	1	SAGGTSMARCTGVAGSAGTCWGG	e	IgG FR1
	2	AATTTTCTGTCCACYTTGGTGCT	as	IgG cs
60 VL	201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	as	kappa cs
	201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	as	kappa cs
60 VH	1	SAGGTSMARCTGVAGSAGTCWGG	e	IgG FR1
	2	AATTTTCTGTCCACYTTGGTGCT	as	IgG cs

e = efectora; as = antisentido, cs = región constante  
<sup>+</sup> VL = región variable de cadena ligera, VH = región variable de cadena pesada; \* núm. según el sistema de codificación interna de Bioceros; \*\* cebadores degenerados: M = C o A; V = G, A o C; N = A, C, G o T; Y = C o T; R = A o G; W = A o T; y S = G o C.

El cebador 1 es un cebador sentido diseñado para reasociarse con el marco 1 (FR1) de la región VH de ratón; los cebadores 2 y 204 son cebadores antisentido que se unen con la región constante de cadenas pesadas de ratón. Los cebadores 213 y 265 son ambos cebadores efectores que se unen con FR1 de las regiones VL de ratón (κ); los cebadores 4 y 201 son ambos cebadores antisentido diseñados para reasociarse con la cadena ligera κ constante de ratón. Finalmente, el cebador 317 se diseñó para reconocer una parte de una secuencia del péptido señal de ratón aguas arriba de la región FR1.

Se realizaron varias PCR diferentes utilizando combinaciones de cebadores que se muestran en la Tabla 3. Se amplificaron las regiones V de ratón anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60. Sorprendentemente, las regiones de cadena ligera variable de ratón anti-C2 35 y 60 se amplificaron utilizando solo el cebador 201 antisentido.

5 Se utilizó la ADN polimerasa Accuprime™ Pfx (Invitrogen) para amplificar las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60 de ratón. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Los productos de las reacciones de PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO® para el análisis de secuencia. A partir de plásmidos que contenían un inserto de PCR, los insertos clonados se analizaron mediante secuenciación de ADN (realizada por ServicXS B.V., Leiden, Países Bajos y Macrogen, Amsterdam, Países Bajos) para obtener la secuencia consenso para las regiones V de los mAb anti-C2. Se obtuvieron al menos 3 secuencias informativas de VH y de VL para todos los mAb examinados. Se debe observar que, debido a la naturaleza de los cebadores efectores utilizados, los primeros 6-8 aminoácidos N-terminales son dictados por los cebadores degenerados utilizados para casi todas las secuencias consenso de aminoácidos determinadas. Teóricamente, las secuencias originales del ratón pueden diferir en estas regiones. Se determinaron las secuencias consenso de aminoácidos de las regiones VH y VL de anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60 de ratón, es decir, SEC ID NO. 2 y NO. 3, SEQ ID NO. 10 y NO. 11, SEC ID NO. 18 y NO. 19, SEC ID NO. 26 y NO. 27, SEC ID NO. 34 y NO. 35, respectivamente.

La enumeración o discusión de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta memoria descriptiva no necesariamente debe tomarse como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

**Ejemplo 11: Generación de IgG1k humana y/o IgG4k humana quiméricas (es decir, con intercambio de dominios constantes de IgGk de ratón por dominios constantes de IgGk humanos) anti-C2 del complemento humano 5F2.4, 13, 32, 35 y 60**

Basándose en las secuencias de las regiones V murinas identificadas (véase el Ejemplo 10), se diseñaron versiones quiméricas de anticuerpos humanos de los mAb anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60 de ratón. Con este fin, las secuencias de ADNc optimizadas para las células CHO SEQ ID NO. 47 (que codifican la cadena pesada de IgG1 humana quimérica del mAb 32 anti-C2 humano) y SEQ ID NO. 48 (que codifica la cadena ligera k humana quimérica de 32 anti-C2 humano) se adquirieron de GENEART (Regensburg, Alemania), que codificó un péptido señal murino seguido de la cadena pesada variable murina conectada a la región constante de IgG1 humana o seguida de la cadena ligera variable murina conectada a la región constante kappa humana, respectivamente.

Además, se generó un formato de IgG4 quimérica humana (estabilizada) de anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60. Para esto, las regiones de cadena pesada variable y ligera variable y se amplificaron mediante PCR con los cebadores que se muestran en la Tabla 4. Con propósitos de subclonación, se incorporaron sitios de restricción apropiados en las porciones N y C terminales de los ADNc que codifican las regiones V. La cadena ligera kappa del anticuerpo anti-C2 del complemento núm. 32 no se amplificó, debido a que ya estaba disponible una construcción a partir de la construcción k humana quimérica utilizada para la generación de IgG1k humana quimérica (véase más arriba). Los ADNc murinos nativos se utilizaron como moldes para todas las reacciones de PCR, excepto la cadena pesada variable del anticuerpo anti-C2 del complemento núm. 32. Para este último, se utilizó ADNc optimizado con CHO de la construcción de IgG1 humana quimérica (véase más arriba).

Tabla 4. Cebadores de PCR utilizados para amplificar regiones variables de cadena pesada variable y ligera variable de los mAb anti-C2

región <sup>+</sup>	núm.*	secuencia del cebador**	
5F2.4 VL	356	CCGCGGGAGTGCACAGCGACATTGTGCTGACACAGTCTCC	e
	301	CGGTCCGTTTTATTTCCAAGTTG	as
5F2.4 VH	379	GCCGCGGGAGTGCACAGCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGG	e
	382	CGCTAGCAGCAGAGACAGTGACCAGAGT	as
13 VL	336	CCGCGGGAGTGCACAGCGATGTCCTCATGACACAAACGCCTCTCTCCCTG	e
	286	CGGTCCGTTTTGATTTCCAGCTTG	as
13 VH	333	CCGCGGGAGTGCACAGTCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGG	e
	290	GCTAGCTGAGGAGACGGTGACTG	as
32 VH	359	CCGCGGGAGTGCACAGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTG	e
	361	GCTAGCAGAGGACACGGTCACGG	as

región <sup>+</sup>	núm.*	secuencia del cebador**	
35 VL	342	CCGCGGGAGTGCACAGCGACATTGTGATGTCACAGTCTCC	e
	286	CGGTCCGTTTATTTCAGCTTG	as
35 VH	339	CCGCGGGAGTGCACAGTCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGG	e
	290	GCTAGCTGAGGAGACGGTGACTG	as
60 VL	349	CCGCGGGAGTGCACAGCGACATCCAGATGACTCAGTCTCC	e
	301	CGGTCCGTTTTATTTCCAAGTCTTG	as
60 VH	345	CCGCGGGAGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTGG	e
	348	GCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGG	as

s = efectora; as = antisentido

<sup>+</sup> VL = región variable de cadena ligera, VH = región de cadena pesada; \* núm. según el sistema de codificación interna Bioceros; \*\* cebadores degenerados: variable M = C o A; V = G, A o C; N = A, C, G o T; Y = C o T; R = A o G; W = A o T; y S = G o C.

Se utilizó ADN polimerasa Accuprime™ *Pfx* (Invitrogen) para amplificar las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de los anti-C2 5F2.4, 13, 35 y 60, y la cadena pesada variable del anti-C2 32. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Los productos de las reacciones de PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO® para el análisis de secuencia. A partir de los plásmidos que contienen un inserto de PCR, los insertos clonados se analizaron mediante secuenciación de ADN (Macrogen, Amsterdam, Países Bajos) para obtener las regiones V correctas que contenían los sitios de restricción apropiados. Posteriormente, las regiones de cadena pesada variable se subclonaron en el plásmido de expresión v319 utilizando *SacIII/NheI* que es un derivado de pcDNA3.1 que contiene ADNc que codifica un péptido señal murino seguido de la región constante de cadena pesada de IgG4 humana estabilizada. Las regiones de la cadena ligera variable se subclonaron en un plásmido de expresión v322 similar utilizando *SacIII/RsrII*, que contiene, sin embargo, ADNc que codifica un péptido señal murino combinado con la región constante de la cadena ligera κ humana.

Para las secuencias de ADNc de anticuerpos IgG4κ humanos quiméricos anti-C2 del complemento humano, véanse *SEQ ID NO. 42* (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 5F2.4), *NO. 43* (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 5F2.4), *NO. 44* (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 13), *NO. 45* (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 13), *NO. 46* (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 32), *NO. 48* (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 32), *NO. 49* (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 35), *NO. 50* (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 35), *NO. 51* (que codifica la cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 60), y *NO. 52* (que codifica la cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 60).

Para las secuencias de aminoácidos de anticuerpos IgG1κ humanos quiméricos e IgG4κ humanos quiméricos anti-C2 del complemento humano, véanse *SEQ ID NO. 53* (cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 5F2.4), *NO. 54* (cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 5F2.4), *NO. 55* (cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 13), *NO. 56* (cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 13), *NO. 57* (cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 32), *NO. 58* (cadena pesada de IgG1 humana quimérica de anti-C2 32), *NO. 59* (cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 32), *NO. 60* (cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 35), *NO. 61* (cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 35), *NO. 62* (cadena pesada de IgG4 humana quimérica de anti-C2 60), y *NO. 63* (cadena ligera κ humana quimérica de anti-C2 60).

#### **Ejemplo 12: Caracterización de la unión de anticuerpos IgG1κ y/o IgG4κ quiméricos de ratón-humano anti-complemento humano C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60**

Los anticuerpos quiméricos de ratón-humano (versión IgG1K humana para anti-C2 32, y versión IgG4K humana para anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60) se expresaron utilizando el Sistema de Expresión MAX CHO (células CHO-S) FreeStyle™ (Invitrogen). Los anticuerpos quiméricos de ratón-humano anti-C2 del complemento humano expresados se purificaron utilizando columnas de cromatografía de afinidad de proteína A (GE Healthcare). Utilizando el mismo procedimiento ELISA que se describe en el Ejemplo 3, todos los mAAb quiméricos anti-C2 se analizaron para determinar la unión a C2 recombinante alto (200 ng por pocillo) y bajo (25 ng por pocillo). Brevemente, las placas ELISA (Corning) se revistieron con la cantidad indicada de C2 en PBS durante la noche a 4°C. Después de un lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 al 0,05%, las placas se bloquearon con PBS/Tween 20 al 0,05%/fracción V de BSA al 1% (Roche) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se incubaron con 0, 0,00002 - 20,0 (etapas de dilución 1:10 veces en tampón de bloqueo) µg/ml de IgG1K y/o IgG4K quimérica de ratón-humano purificada con proteína A anti-C2 5F2.4, 13, 32, 35 y 60 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un

lavado exhaustivo en PBS/Tween 20 al 0,05%, se determinó la unión de los anticuerpos con anticuerpos específicos anti-IgG humana (cadenas pesadas y ligeras) de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos 1:5000 (Jackson ImmunoResearch) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por una solución lista para su uso de sustrato *TMB* (Invitrogen) para la detección colorimétrica. Después de añadir H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia de 655 nm) utilizando un lector de microplacas (BioRad).

La Figura 13 (media  $\pm$  DT, n = 2) muestra que las características de unión de los anticuerpos quiméricos eran exactamente las mismas que las de los anticuerpos murinos purificados (Figura 4). Los anti-C2 13 y 32 quiméricos no se unieron bien al C2 aplicado como recubrimiento a baja concentración, mientras que los otros anticuerpos quiméricos se unieron bien a ambas concentraciones de C2. Por lo tanto, la afinidad (relativa) de anti-C2 13 quimérico de ratón-humano (chulgG4K) y 32 (tanto chulgG4k como chulgG1k) parecía ser menor que la del anti-C2 5F2.4, 35 y 60 quimérico de ratón-humano (chulgG4K).

#### 15 **Ejemplo 13: Actividad funcional de IgG4k quimérica de ratón-humano anti-C2 humano 5F2.4, 13, 32, 35 y 60**

Los mAb quiméricos de ratón anti-C2 humanos se probaron en los mismos ensayos que se describen en los Ejemplos 4 (fijación C3 a IgG de la fase sólida), 5 (activación de C3 de la fase líquida en suero por IgG agregada) y 6 (citotoxicidad dependiente del complemento por anticuerpos anti-HLA). Las actividades funcionales de los 5 anticuerpos quiméricos de ratón-humano en estos ensayos fueron similares a las descritas para los anticuerpos murinos, es decir, inhibieron la fijación de C3 a IgG de la fase sólida, inhibieron la activación de C3 en suero por IgG agregada (Figura 14) y previnieron la citotoxicidad dependiente del complemento por anticuerpos anti-HLA (Figura 15).

#### 25 **Ejemplo 14: Determinación de secuencias de aminoácidos N-terminales de regiones variables a partir de anti-C2 5F2.4, 35 y 60 de ratón con cebadores de reasociación en regiones del péptido señal**

Como se menciona en el Ejemplo 10, teóricamente, las secuencias de aminoácidos N-terminales de ratón consenso de regiones variables pueden diferir de las secuencias determinadas debido al uso de cebadores efectores degenerados. Por lo tanto, las regiones VH y VL de los anti-C2 5F2.4, 35 y 60 se determinaron nuevamente utilizando cebadores, que se describen en la Tabla 5, es decir, los cebadores efectores se recogen en regiones del péptido señal de anticuerpos murinos.

35 *Tabla 5. Cebadores de PCR utilizados para amplificar regiones de cadena ligera y pesada variable de ratón consenso de anti-C2 5F2.4, 35 y 60*

<i>región<sup>+</sup></i>	<i>No.*</i>	<i>secuencia de cebador**</i>	
5F2.4 VL	393	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	e
	394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	as
5F2.4 VH	410	ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT	e
	417	CAGTGGATAGACCGATGGGGG	as
35 VL	389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA	e
	394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	as
35 VH	404	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	e
	416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	as
60 VL	383	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	e
	394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	as
60 VH	413	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG	e
	416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	as

e = efectora; as = antisentido

<sup>+</sup> VL = región de cadena ligera variable, VH = región de cadena pesada variable; \* núm. según el sistema de codificación interna Bioceros; \*\* cebadores: M = C o A; V = G, A o C; N = A, C, G o T; Y = C o T; R = A o G; W = A o T; y S = G o C.

El ARN se aisló de las células de hibridoma utilizando el RNeasy Mini Isolation Kit (QIAGEN). Se determinó la concentración de ARN (A260 nm) y el ARN se almacenó a -80°C. Mediante la transcriptasa inversa, el ADNc se sintetizó a partir de 2  $\mu$ g de ARN utilizando el RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), y



se almacenó a -20°C.

Se utilizó la ADN Polimerasa Accuprime™ Pfx (Invitrogen) para amplificar las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de ratón anti-C2 5F2.4, 35 y 60. Los conjuntos de cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5. Los productos de PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO® para análisis de secuencia. A partir de plásmidos que contenían un inserto de PCR, los insertos clonados se analizaron mediante secuenciación de ADN (realizada por MacroGen, Amsterdam, Países Bajos) para obtener la secuencia consenso para las regiones V de estos tres mA b anti-C2. Se obtuvieron al menos 3 secuencias informativas de VH y de VL para todos los mA b examinados.

Al utilizar conjuntos de cebadores de la Tabla 5, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de ratón consenso de anti-C2 5F2.4, y las secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable de ratón consenso de anti-C2 35 y 60 resultaron ser idénticas a las secuencias de aminoácidos encontradas en el Ejemplo 10 (es decir, SEQ ID NO. 2, 27 y 35, respectivamente).

Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable N-terminal de anti-C2 5F2.4 (SEQ ID NO. 96) difería en un aminoácido (I2N) de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable N-terminal anti-C2 5F2.4 (SEQ ID NO. 3) encontrada en el Ejemplo 10. La secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable N-terminal de anti-C2 35 (SEQ ID NO. 97) difería en un aminoácido (Q 1E) de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable N-terminal de anti-C2 35 (SEQ ID NO. 26) encontrada en el Ejemplo 10. La secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de N-terminal de anti-C2 60 (SEQ ID NO. 98) difería en tres amino ácidos (Q3A, Q5K y Q6E) de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable N-terminal de anti-C2 60 (SEQ ID NO. 34) encontrada en el Ejemplo 10.

#### **Ejemplo 15: Generación de IgG4/kappa humanizada anti-C2 del complemento humano 5F2.4**

Basándose en determinadas regiones V murinas (SEQ ID NO: 2 para la región VH, y SEQ ID NO: 96 para la región VL, véase el Ejemplo 13) de anti-C2 5F2.4 de ratón, se generaron versiones de anticuerpos humanizados.

Se obtuvieron secuencias humanizadas de cadena ligera variable y secuencias humanizadas de cadena pesada variable de anti-C2 5F2.4 de ratón utilizando la tecnología de Germline Humanisation (injerto de CDR) (realizada por Antitope Ltd, Cambridge, Reino Unido). Para secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada humanizadas, véase SEC ID NO. 99 (VL1 de 5F2.4), 100 (VL2 de 5F2.4), 101 (VL3 de 5F2.4), 102 (VL4 de 5F2.4) y 103 (VH1 de 5F2.4), 104 (VH2 de 5F2.4), 105 (VH3 de 5F2.4), 106 (VH4 de 5F2.4), respectivamente.

Después de este diseño, las secuencias de ADNc (véanse SEC ID NO 107, 108, 109 y 110 (que codifican las versiones 5F2.4 de cadena ligera κ humanizada completa, es decir, VL1, VL2, VL3 y VL4, resp.), y SEQ ID NO. 111, 112, 113 y 114 (que codifican las versiones 5F2.4 IgG4 de cadena pesada humanizada completa, es decir, VH1, VH2, VH3 y VH4, resp.)) se adquirieron de GENEART (Regensburg, Alemania), que codifican un péptido señal seguido por la cadena ligera variable humanizada conectada a la región constante kappa humana, y un péptido señal seguido por la cadena pesada variable humanizada conectada a la región constante de IgG4 humana. Además, todos los anticuerpos humanizados se expresaron como moléculas de IgG4 humana estabilizadas (Angal et al., Mol Immunol 1993, 30: 105). Utilizando las enzimas de restricción adecuadas, los ADNc generados se subclonaron en plásmidos de expresión derivados de pcDNA3.1.

Las versiones humanizadas de 5F2.4 anti-C2 se expresaron utilizando el Sistema de Expresión FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Los anticuerpos humanizados generados se purificaron utilizando columnas de cromatografía de afinidad de proteína A (GE Healthcare). De esta manera, se generaron ocho versiones humanizadas purificadas del anticuerpo 5F2.4, es decir, VL1VH1, VL2VH1, VL1VH2, VL2VH2, VL3VH3, VL4VH3, VL3VH4 y VL4VH4.

Para las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-C2 5F2.4 humanizado completo, véanse SEQ ID NO. 115, 116, 117 y 118 (que codifican versiones 5F2.4 de cadena ligera κ humanizada, es decir, VL1, VL2, VL3 y VL4, resp.), y SEQ ID NO. 119, 120, 121 y 122 (que codifican versiones 5G2.4 de IgG4 de cadena pesada humanizada, es decir, VH1, VH2, VH3 y VH4, resp.).

#### **Ejemplo 16: Caracterización de unión de IgG4/kappa humanizada anti-complemento C2 humano 5F2.4**

La unión de las versiones de los mA b humanizados anti-C2 5F2.4 VL3VH3, VL4VH3, VL3VH4 y VL4VH4 a C2 se evaluó mediante ELISA como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 12 (el C2 humano recombinante se inmovilizó en placas a 2 µg/ml). Como se muestra en la Figura 17, las cuatro versiones examinadas de mA b anti-C2 5F2.4 humanizado demostraron una unión similar a la fase sólida C2 en comparación con el mA b anti-C2 5F2.4 químico.

#### **Ejemplo 17: Actividad funcional de IgG4/kappa humanizada anti-C2 del complemento humano 5F2.4**

Los experimentos de prueba cruzados modificados se llevaron a cabo de manera similar a la descrita para los anticuerpos anti-C2 de ratón en el Ejemplo 6.

5 El primer anticuerpo monoclonal anti-HLA (clon W6/32) se utilizó para sensibilizar las células. Las versiones quiméricas de anticuerpos anti-C2 5F2.4 y anti-C2 humanizados VL3VH3, VL4VH3, VL3VH4 y VL4VH4 se probaron a razones molares Ab:C2, que oscilaron entre 5:1 y 0,312:1 (se suponía que la concentración nativa de C2 en suero normal era 20 µg/ml). Todos los mAb anti-C2 (quiméricos y cuatro versiones de Ab humanizados examinados) inhibieron la destrucción dependiente del complemento de las células sensibilizadas con el anticuerpo anti-HLA W6/32 (véase la Figura 18). Las versiones que contienen VL3 (es decir, VL3VH3 y VL3VH4) mostraron una  
10 inhibición comparable al mAb quimérico anti-C2 5F2.4 en la prueba cruzada. Además, las versiones que contienen VL3 (es decir, VL3VH3 y VL3VH4) parecían superar a las versiones que contenían VL4 (es decir, VL4VH3 y VL4VH4).

15 Además, también se realizó una prueba cruzada con suero del paciente que contenía altos niveles de anticuerpos anti-HLA para sensibilizar las células, que se asemeja más estrechamente a la situación fisiológica. Las versiones anticuerpos quiméricos anti-C2 5F2.4 y anti-C2 humanizados VL3VH3, VL4VH3, VL3VH4 y VL4VH4 se probaron a 160 µg/ml. Todos los mAb anti-C2 (versiones de Ab quiméricos y cuatro humanizados examinados) inhibieron la destrucción dependiente del complemento de las células sensibilizadas con anticuerpos anti-HLA del suero (véase la  
20 Figura 19).

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que se une al factor C2 del complemento humano que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, en donde la región variable de cadena pesada comprende:
- 5 (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;  
 (b) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y  
 (c) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
- 10 en donde la región variable de cadena ligera comprende:
- (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;  
 (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y  
 15 (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9,
- en donde la molécula de unión se une al dominio C2b del factor C2 del complemento humano.
2. Una molécula de unión según la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina
- 20 (a) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 respectivamente (resp.) o SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 96 resp.; o  
 (b) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 99 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 100 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 101 resp.; SEQ ID NO: 103 y SEQ ID NO: 102 resp.; SEQ ID NO: 104 y SEQ ID NO: 102 resp.; SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 102 resp.; o SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 102 resp.; o  
 30 (c) que comprende las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) y/o (b) pero en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 1-5 sustituciones de aminoácidos y en donde las 1-5 sustituciones de aminoácidos no están en las regiones CDR.
- 35 3. Una molécula de unión según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un fragmento Fab, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
4. Un anticuerpo según la reivindicación 3, que es un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgE o IgM humanizado o desimmunizado, tal como un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 40 5. Un anticuerpo según la reivindicación 4,
- (a) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54; o  
 (b) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 122; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 122; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 121; SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 122; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 119; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 120; SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 121; o SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 122; o  
 50 (c) que comprende las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) y/o (b) pero en donde una o ambas de dichas secuencias comprenden 1-5 sustituciones de aminoácidos y en donde las 1-5 sustituciones de aminoácidos no están en las regiones CDR.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de unión o un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 55 7. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 107; SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109; SEQ ID NO: 110; SEQ ID NO: 111; SEQ ID NO: 112; SEQ ID NO: 113; o SEQ ID NO: 114.
- 60 8. Un vehículo o vector de suministro de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7.
9. Una célula aislada o recombinante, o célula de cultivo celular *in vitro* que comprende una molécula o vector de

ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

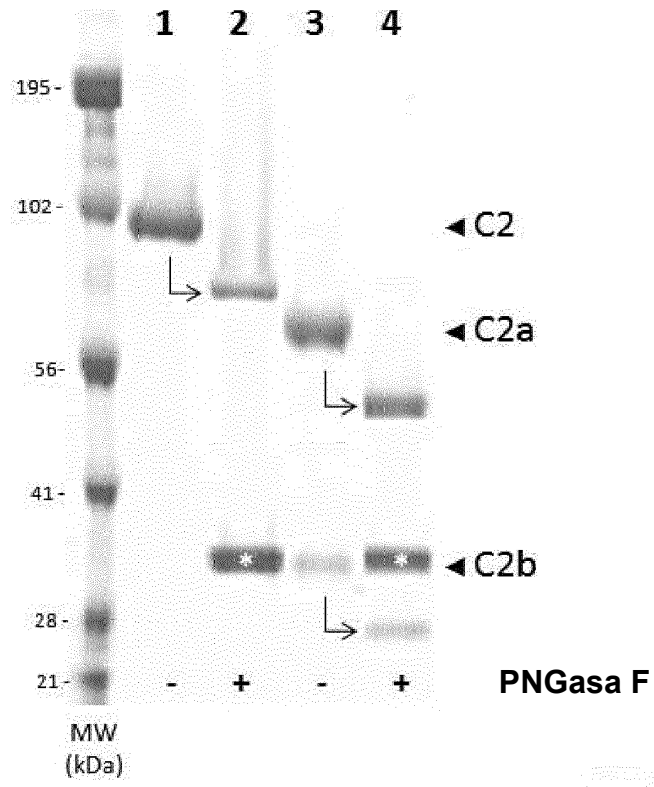
10. Una molécula de unión o anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en terapia.

5 11. Una molécula de unión o anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de un individuo que padece una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurológica o una lesión por isquemia-reperfusión (I/R).

10 12. Una molécula de unión o anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, en donde dicho individuo sufre inflamación mediada por anticuerpos o lesión por isquemia-reperfusión, tal como infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular, sepsis, enfermedades del complejo inmunitario tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, trauma múltiple, neuropatía motora multifocal, rechazo de aloinjerto renal mediado por anticuerpos, anemia hemolítica (auto)inmunitaria, derivación cardiopulmonar y otra cirugía vascular, nefropatía membranosa idiopática, síndrome de Goodpasture.

15 13. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión o anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1



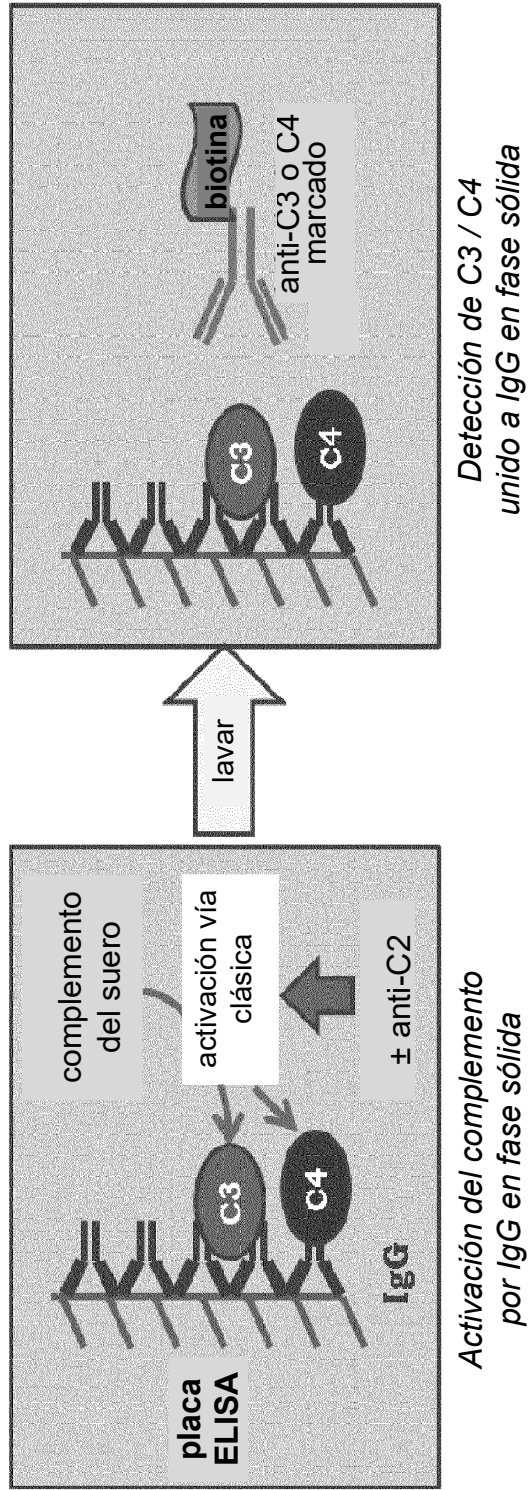
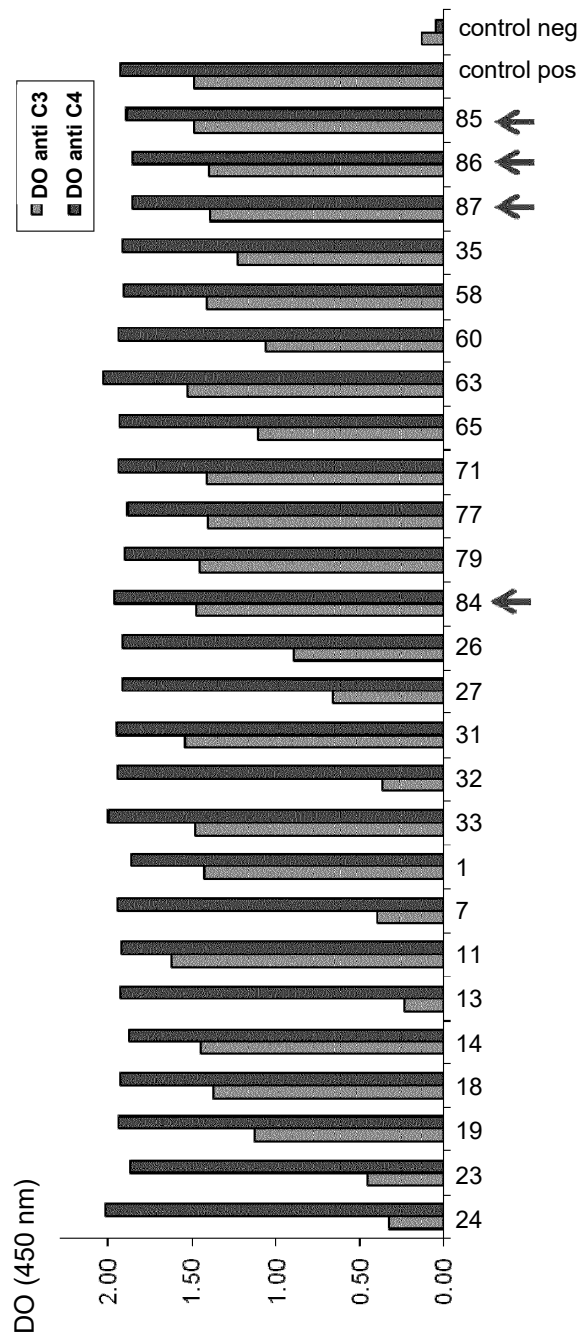


Figura 2

Figura 3A



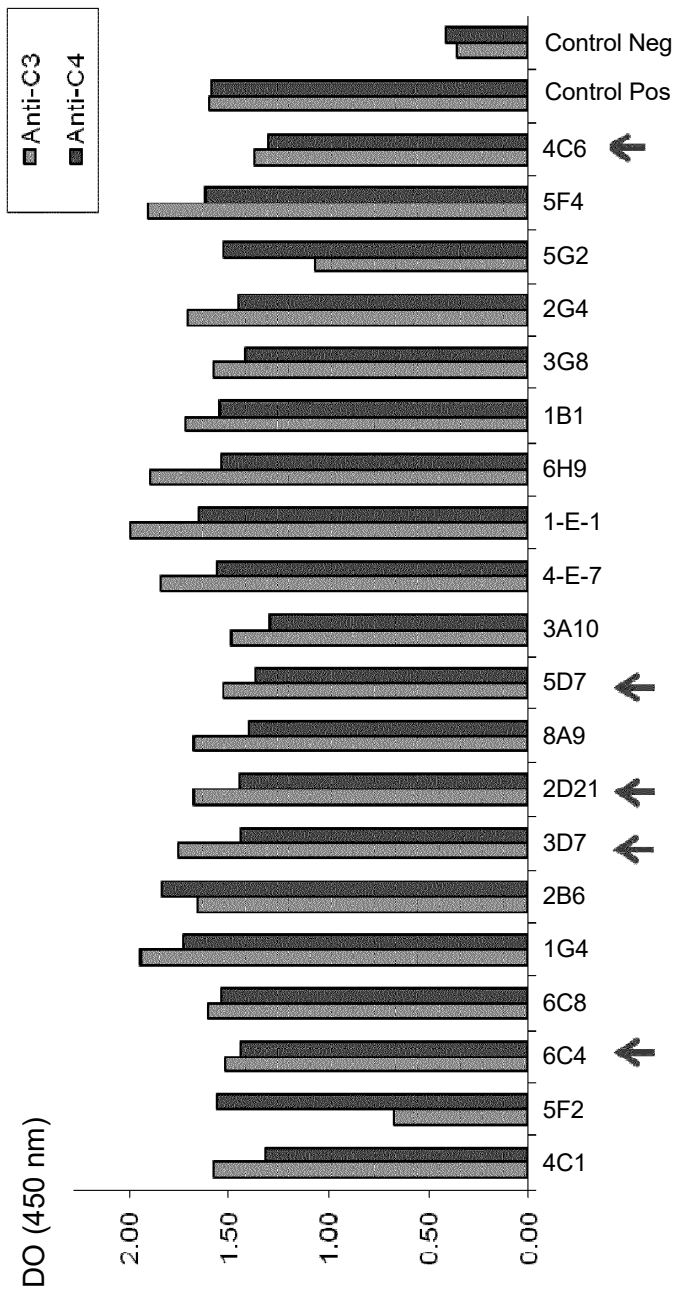


Figura 3B



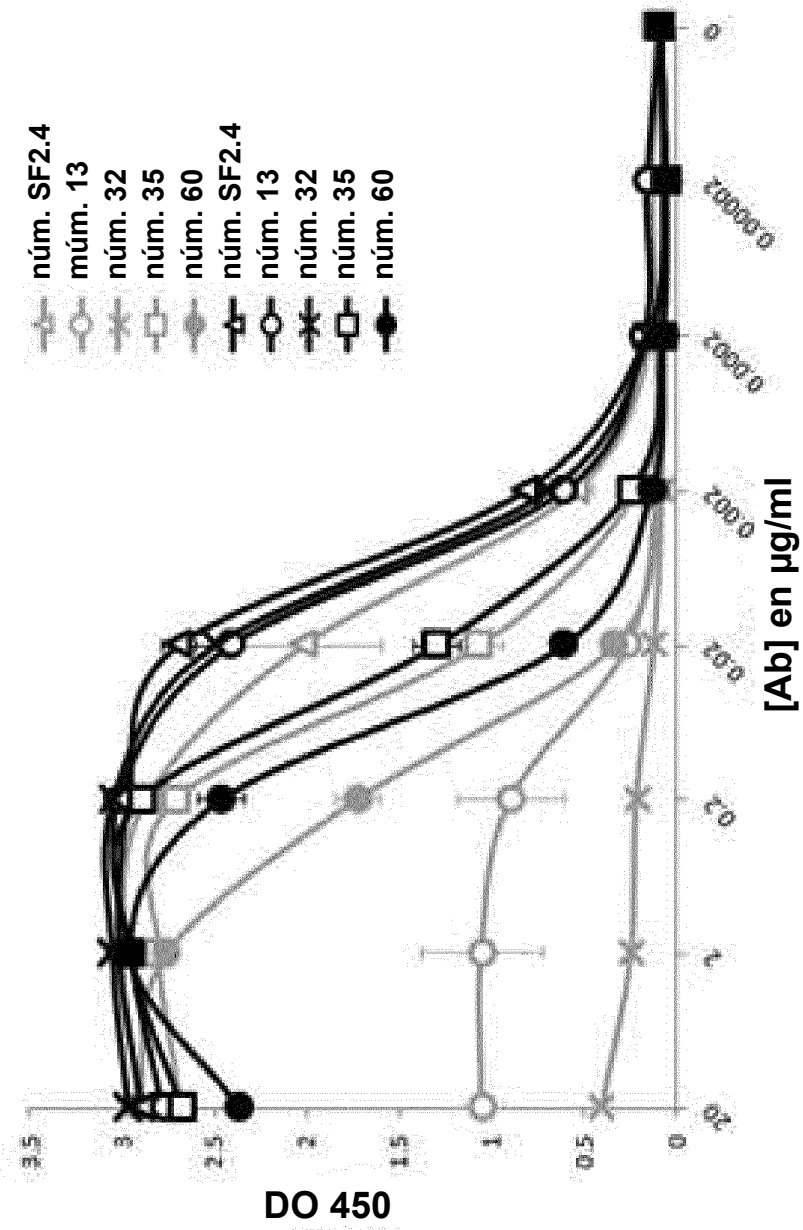
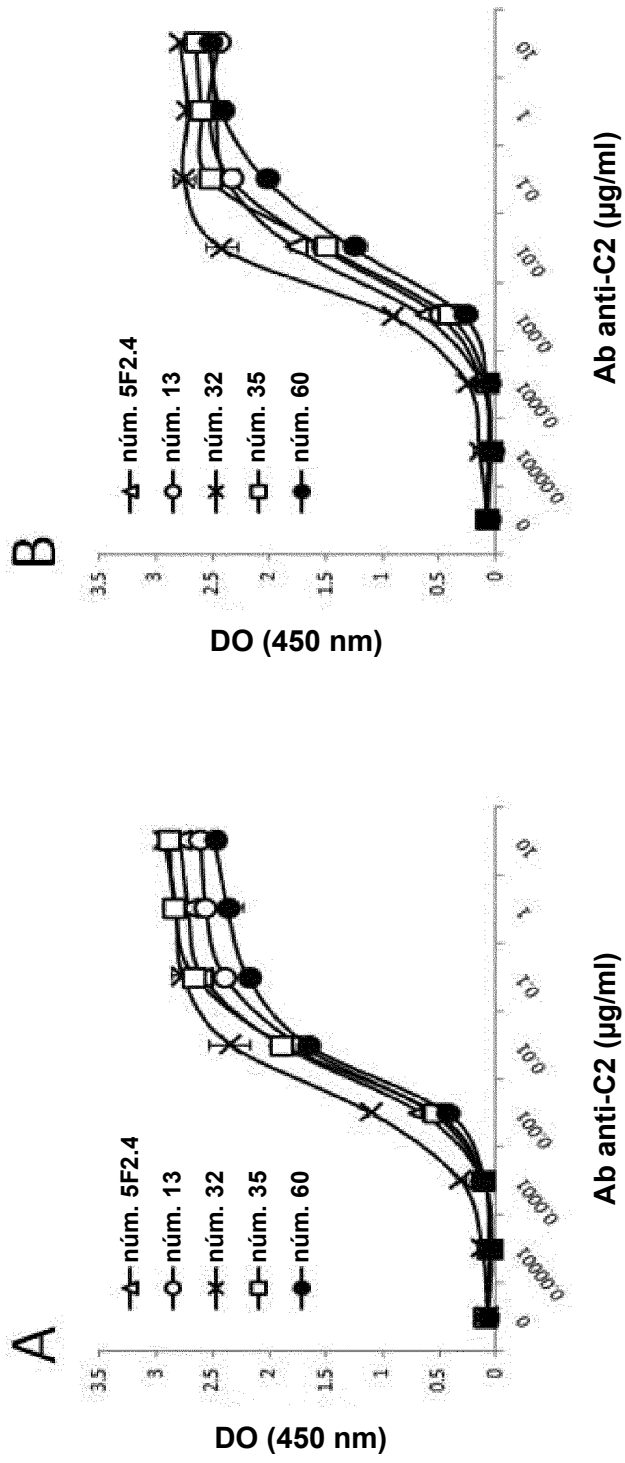
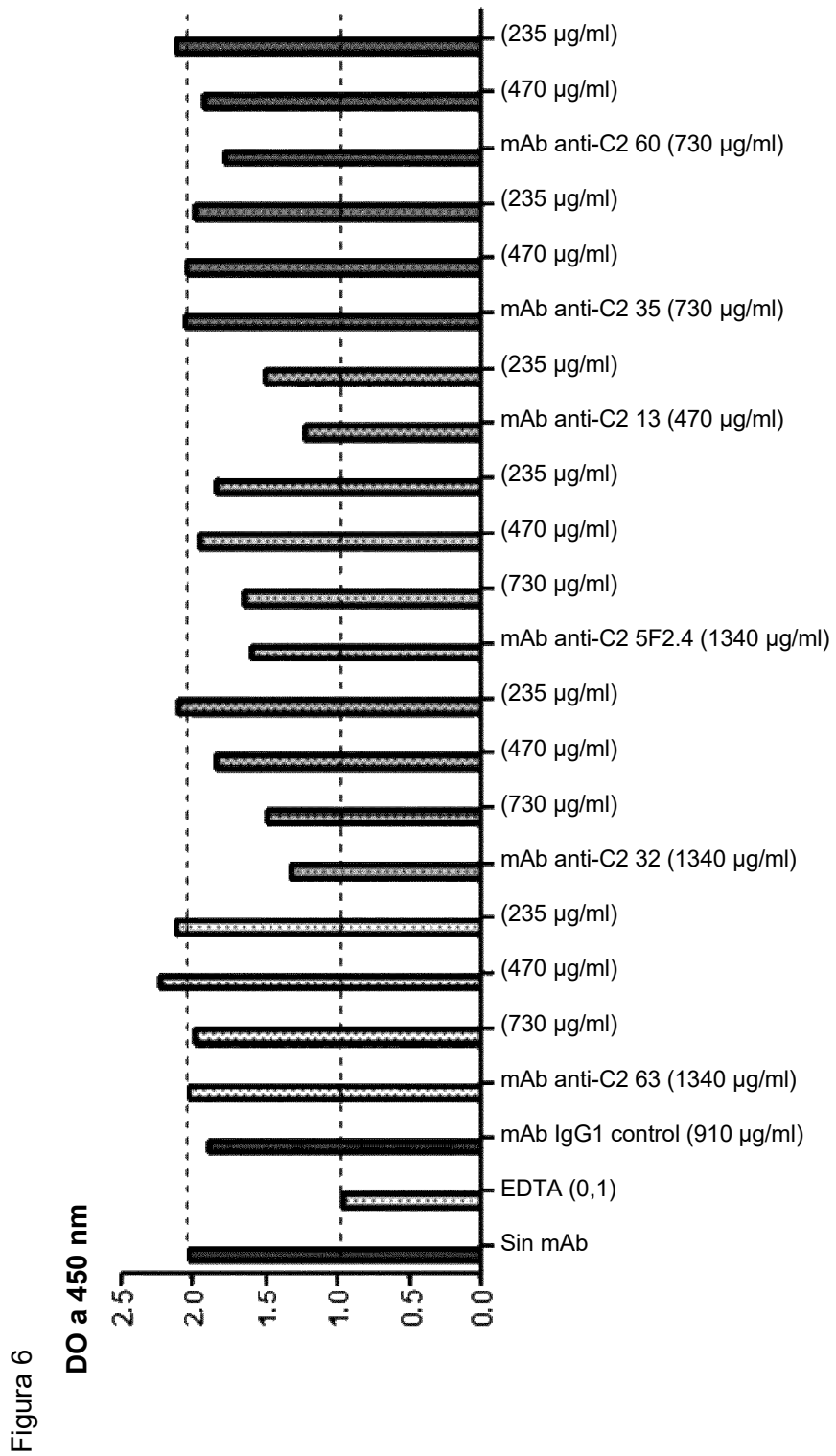


Figura 4

Figura 5





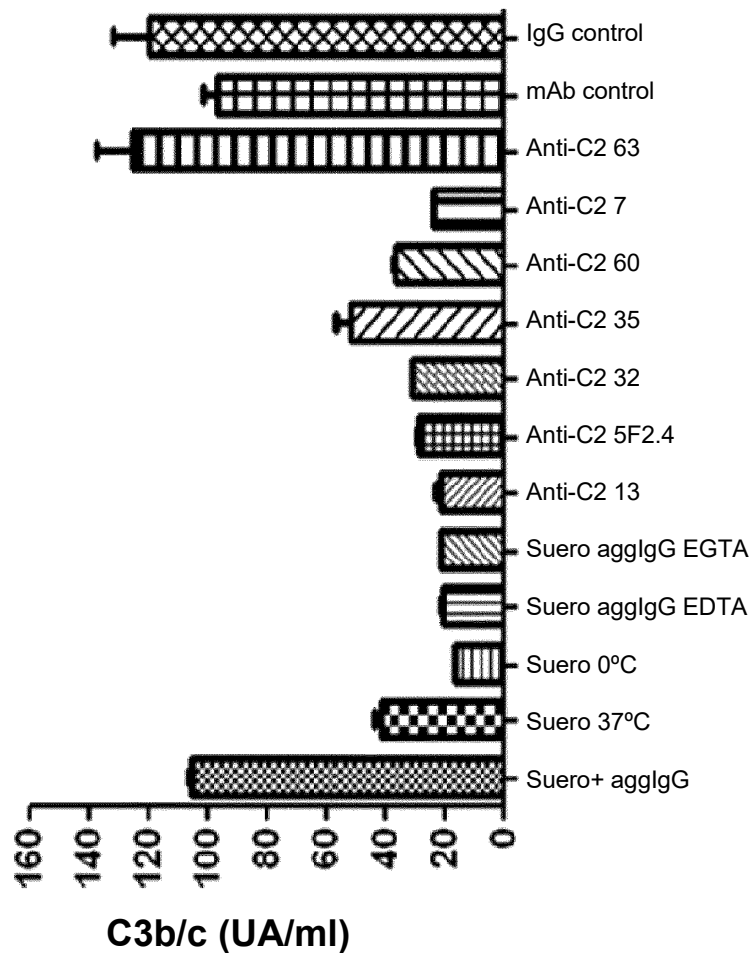


Figura 7

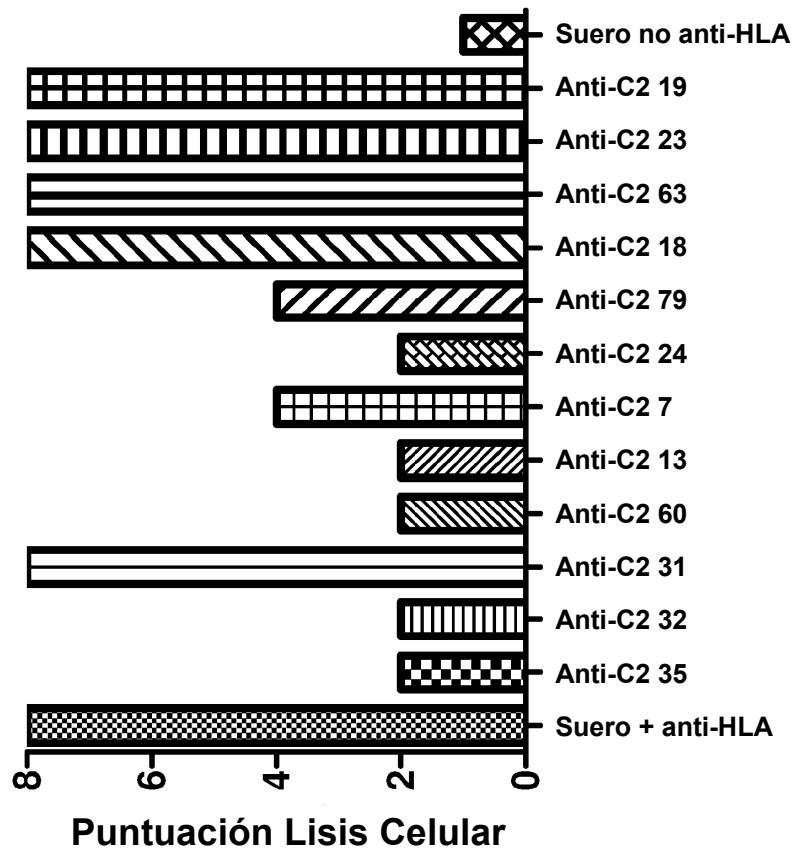


Figura 8

Figura 9

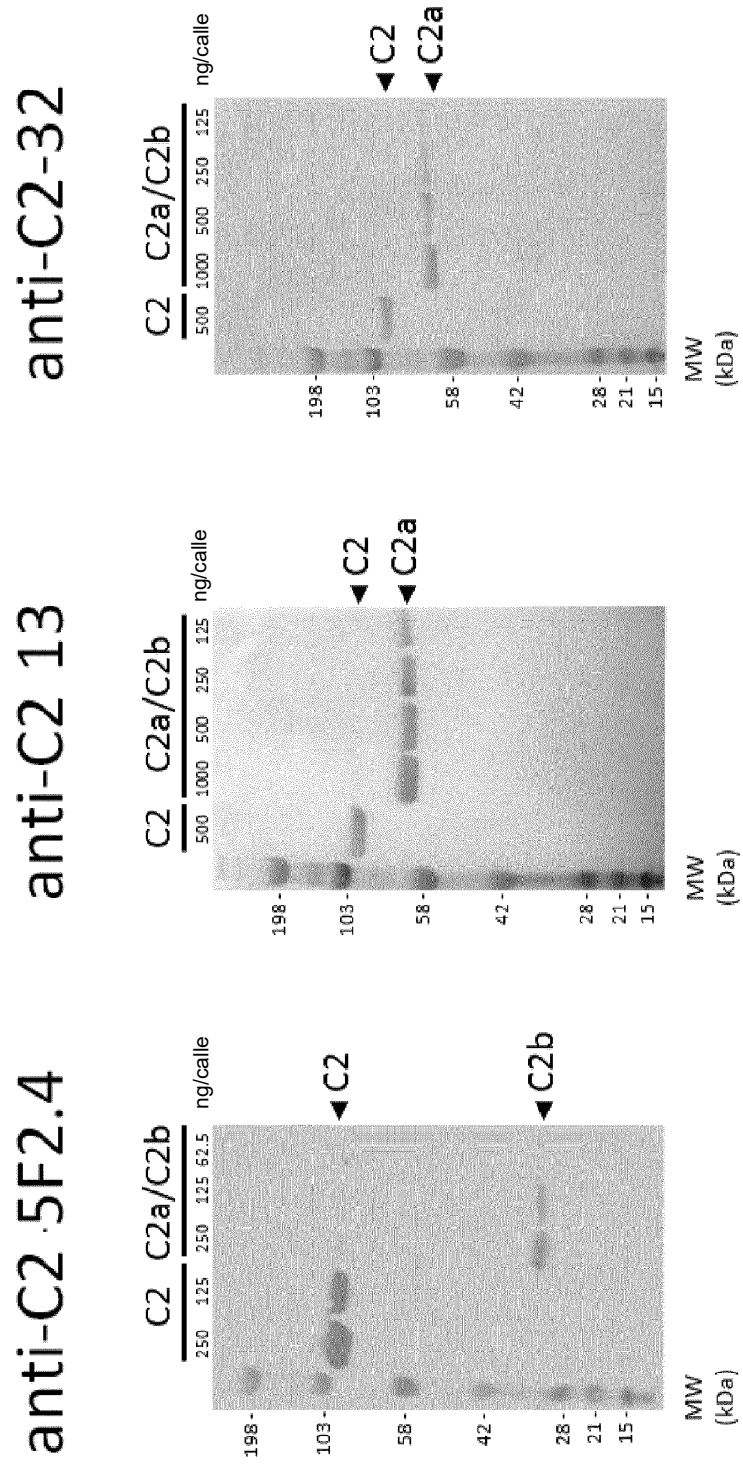


Figura 9 (continuación)

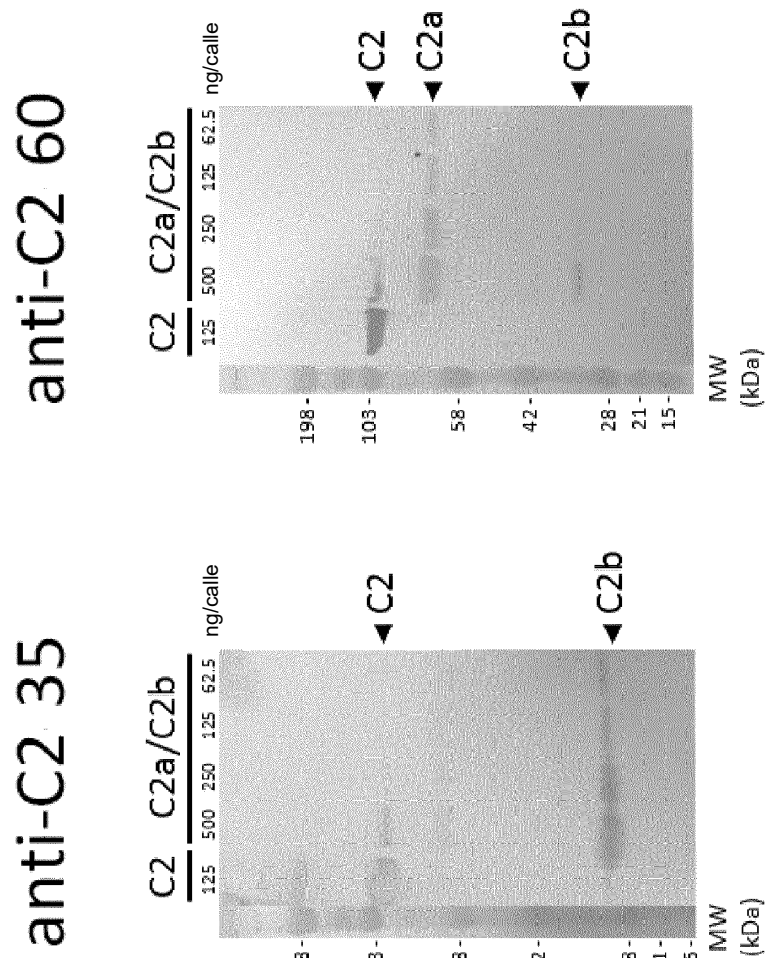


Figura 10A

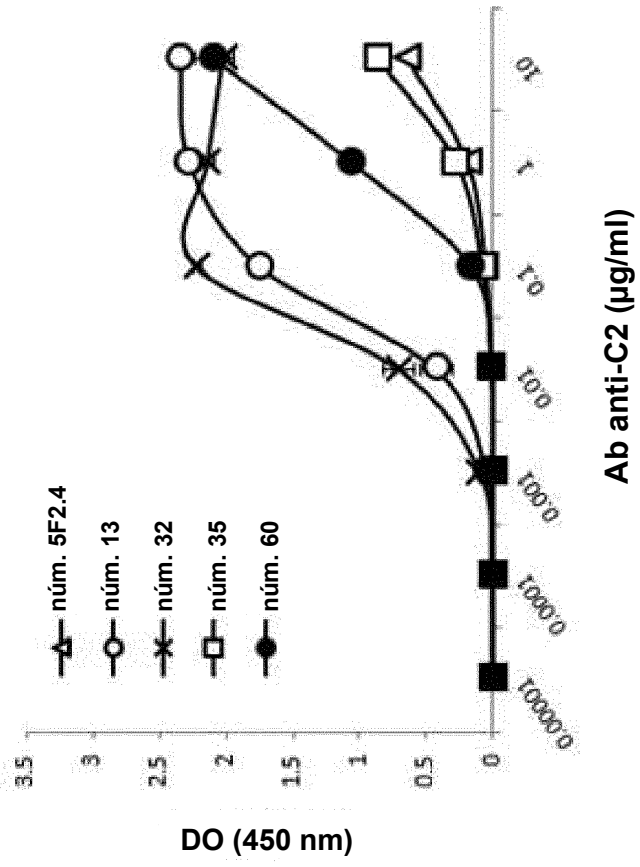




Figura 10B

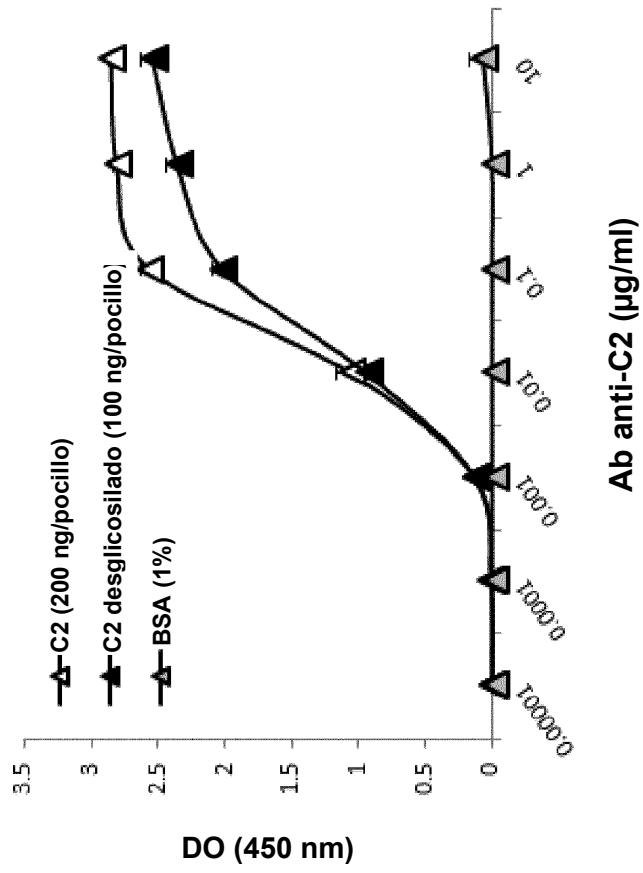


Figura 10C

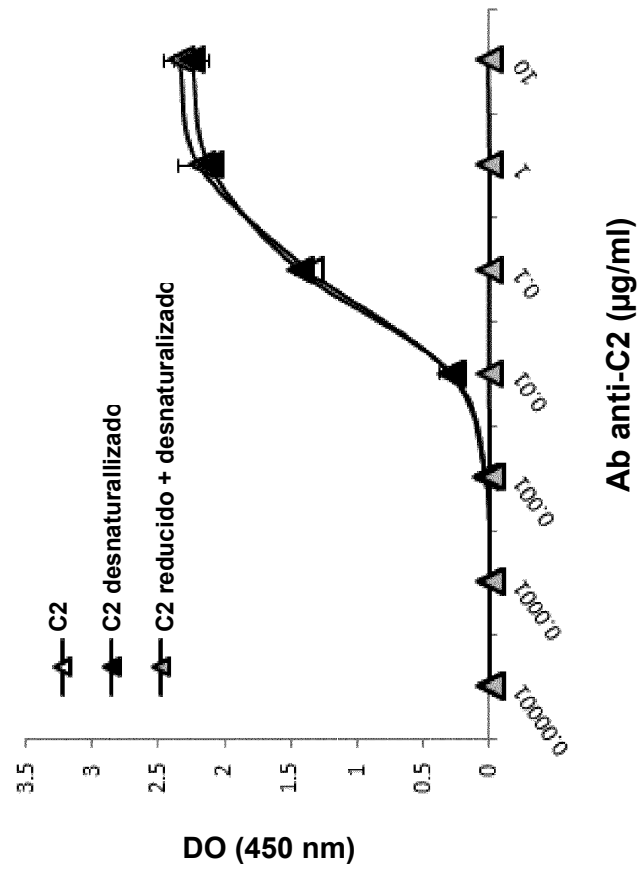


Figura 11

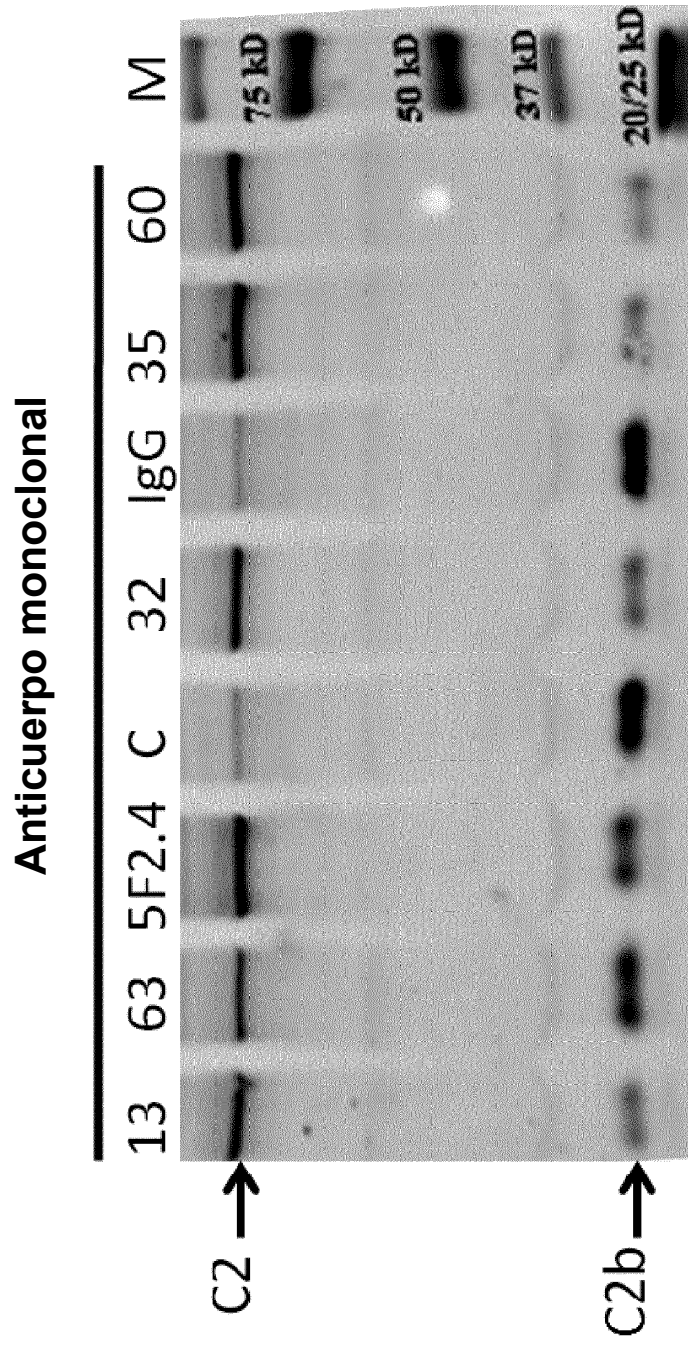
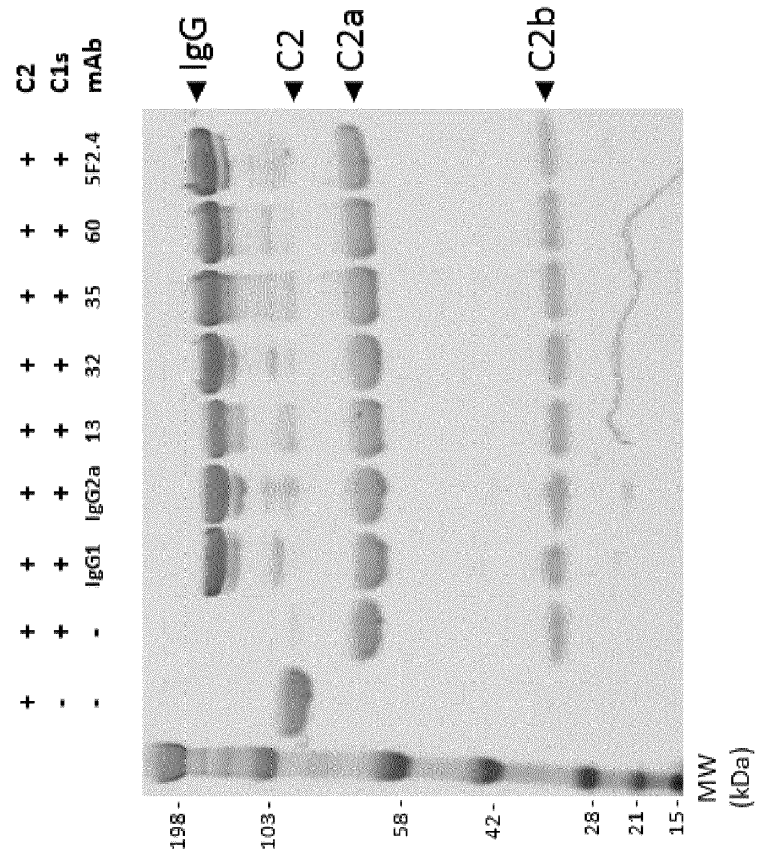


Figura 12



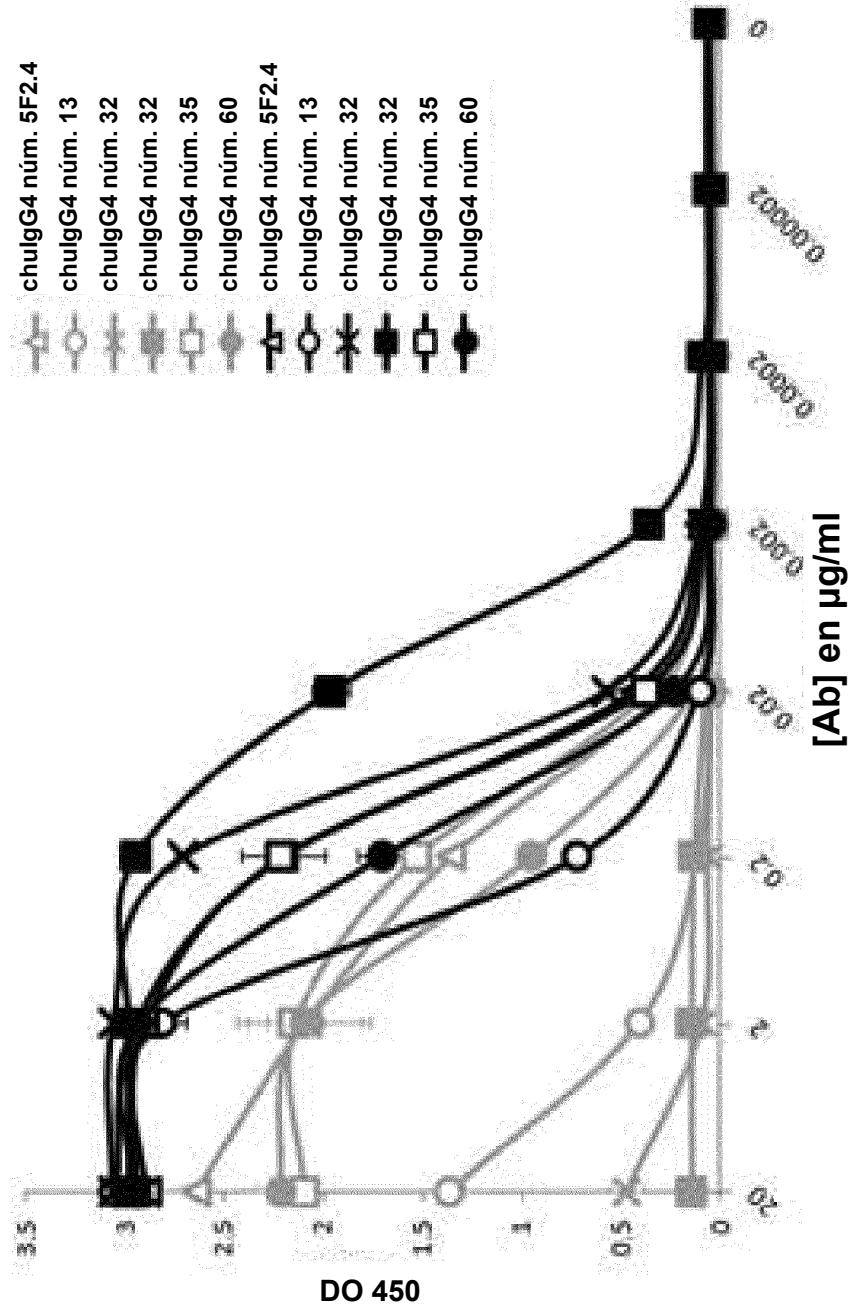


Figura 13

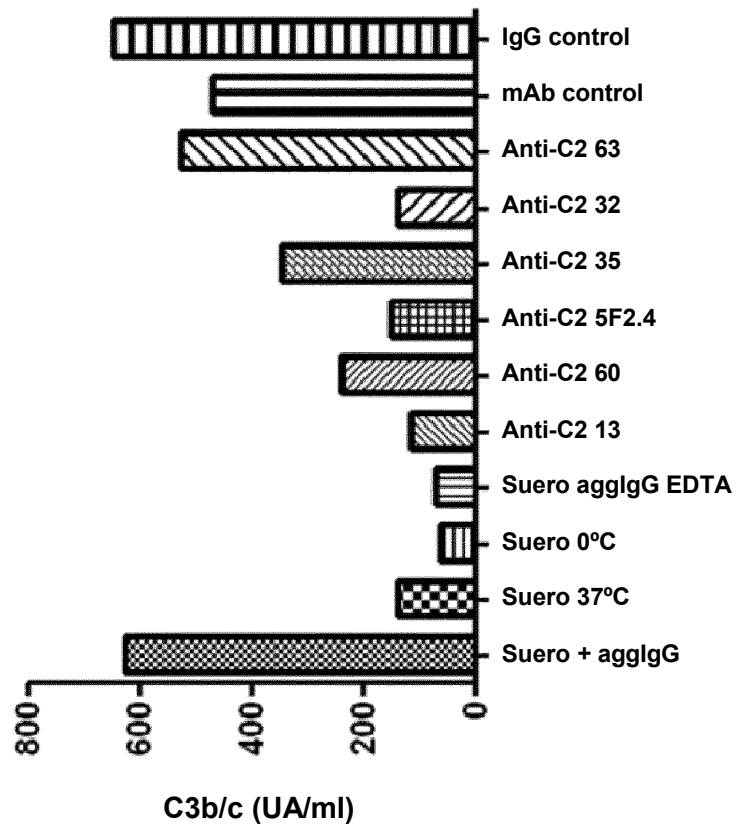


Figura 14

Figura 15

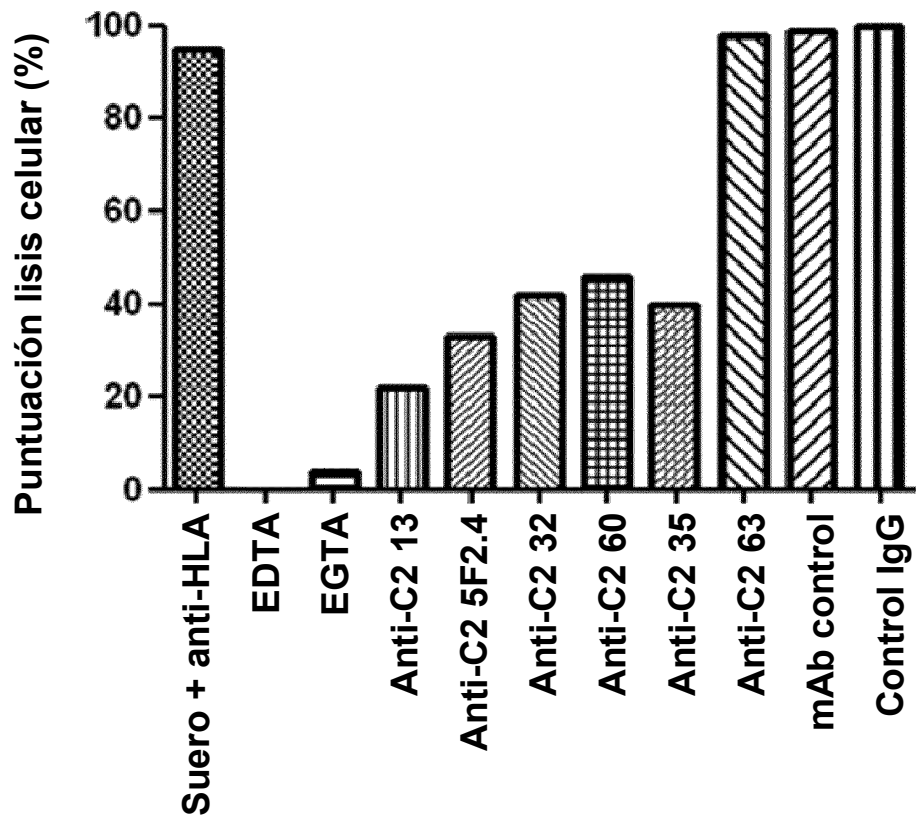


Figura 16

SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de C2 del complemento humano  
(Núm. acceso GenBank NM\_000063; aa 1-752)

```

1  MGPLMVLFLCL LFLYPGLADS APSCPQNVNI SGGTFTLSHG WAPGSLLTYS CPQGLYPSPA
61  SRLCKSSGQW QTPGATRSL KAVCKPVRCP APVSFENGIY TPRLGSYPVG GNVSFECEDG
121 FILRGSPVRQ CRPNGMWDGE TAVCDNGAGH CPNPGISLGA VRTGFRFGHG DKVRYRCSSN
181 LVLTGSSERE CQNGVWSGT EPICRQPYSY DFPEDVAPAL GTSFSHMLGA TNPTQKTKE
241 LGRKIQIQRS GHLNLYLLLD CSQSVSEDF LIFKESASLM VDRIFSFEIN VSVAIITFAS
301 EPKVLMSVLN DNSRDMTEVI SLENANYKD HENGTGTNTY AALNSVYLM NNQMRLLGME
361 TMAWQEIRHA IILLTDGKSN MGGSPKTAVD HIREILNINQ KRNDYLDIYA IGVGKLDVDW
421 RELNELGSKK DGERHAFILQ DTKALHQVFE HMLDVSKLTD TTCGVGNMSA NASDQERTPW
481 HVTIKPKSQE TCRGALISDQ WVLTAAHCFR DGNDHSLWRV NVGDPKSQWG KEFLIEKAVI
541 SPGFDVFAKK NQGILEFYGD DIALLKLAQK VKMSTHARPI CLPCTMEANL ALRRFQGSTC
601 RDHENELLNK QSVPAHFVAL NGSKLNINLK MGVEWTSCAE VVSQEKTMFP NLTDVREVVT
661 DQFLCSGTQE DESPCKGESG GAVFLERRFR FFQVGLVSWG LYNPCLGSAD KNSRKRAPRS
721 KVPPPRDFHI NLFRMQPWL RHLGDVLNFL PL

```

*El péptido señal (secuencia aa 1-20) está recuadrado, el subcomponente C2b está subrayado, (secuencia aa 21-243), y el subcomponente C2a comprende la secuencia de aa 244-752.*

SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada núm. 5F2.4

```

1  EVQLQQSGAE LVKPGASVKI SCKASGYFT DYNMDWVKQS HGKSLEWIGD INPNYESTGY
61  NQKEFGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCARED DHDAFAYWGQ GTLVTVSA

```

SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera núm. 5F2.4

```

1  DIVLTQSPAS VVVSIGQRAT ISCRASKSVR TSGYNYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLKS
61  GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEADAATY YCQHSRELPY TFGGGTKLEI KR

```

**Regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo anti-C2 del complemento humano de ratón núm. 5F2.4: SEQ ID NO: 4-9**

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada núm. 5F2.4

**DYNMD**

SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada núm. 5F2.4

**DINPNYESTGYNQKFKG**

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada núm. 5F2.4

**EDDHDAFAY**

SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera núm. 5F2.4

**RASKSVRTSGYNYMH**

SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera núm. 5F2.4

**LASNLKS**



## ES 2 784 616 T3

SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera núm. 5F2.4

**QHSRELPYT**

SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos región variable de cadena pesada núm. 13

1 QVQLQOPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT IYYMYWVKQR PGQGLEWIGE VDPSIGCISF  
61 NEKFKSKATL TVDRSSSTAY MHLSSLTSED SAVYYCTRGG TYYAMDYWGQ GTSVTVSS

SEQ ID NO: 11

Secuencia de aminoácidos región variable de cadena ligera núm. 13

1 DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRAGQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF  
61 SCVPDRFSGS GSCTDFTLKI SRVEAEDLCV YYCFQGSHPV WTFGGGTKLE IKR

**Regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo anti-C2 del complemento humano de ratón núm. 13: SEQ ID NO: 12-17**

SEQ ID NO: 12 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada núm. 13

**IYYMY**

SEQ ID NO: 13 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada núm. 13

**EVDPSIGGISFNEKFKS**

SEQ ID NO: 14 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada núm. 13

**GGTYAMDY**

SEQ ID NO: 15 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera núm. 13

**RAGQSIVHSNGNTYLE**

SEQ ID NO: 16 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera núm. 13

**KVSNRFS**

SEQ ID NO: 17 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera núm. 13

**FQGSHPWT**

SEQ ID NO: 18 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada núm. 32

1 QVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYDMYWVKQR PGQGLEWIGE INPSNGDTNF  
61 NEKFKSKATL TVDKSSSTAH MQLSSLTSED SAVYYCTRGG TFYAMDYWGQ GTSVTVSS

SEQ ID NO: 19 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera núm. 32

1 DIQMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF  
61 SCVPDRFSGS GSCTDFTLKI SRVEAEDLCV YYCFQGSHPV WTFCCGTKLE IKR

**Regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo anti-C2 del complemento humano de ratón num. 32 SEQ ID NO: 20-25**

SEQ ID NO: 20 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada núm. 32

**SYDMY**

SEQ ID NO: 21 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada núm. 32

**EINPSNGDTNFNEKFKS**

## ES 2 784 616 T3

SEQ ID NO: 22 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada núm. 32

**GGTFYAMDY**

SEQ ID NO: 23 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena liger núm. 32

**RSSQSIVHSNGNTYLE**

SEQ ID NO: 24 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera núm. 32

**KVSNRFS**

SEQ ID NO: 25 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera núm. 32

**FQGSHPWT**

SEQ ID NO: 26 Secuencia de aminoácidos región variable de cadena pesada núm. 35

1 QVQLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMHVVKQR PEQGLEWIGW IDPENCDEY  
61 APKFQ GKATM TADTSSNTAY LQLSSTSED TAVYYCNEWK FYAMDDWGQG TSVTVSS

SEQ ID NO: 27 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera núm. 35

1 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSLI YSSNQKNYLA WYQQKPGQSP KLLIYWASTR  
61 ESGVPDRFTG SSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCQQYYSY PRTFGGGTKL EIKR

**Regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpo anti-C2 del complemento humano de ratón num. 35 SEQ ID NO: 28-33**

SEQ ID NO: 28 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada núm. 35

**DYYMH**

SEQ ID NO: 29 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada núm. 35

**WIDPENGDEYAPKFQG**

SEQ ID NO: 30 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada núm. 35

**WKFYAMDD**

SEQ ID NO: 31 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera núm. 35

**KSSQSLLYSSNQKNYLA**

SEQ ID NO: 32 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera núm. 35

**WASTRES**

SEQ ID NO: 33 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera núm. 35

**QQYYSYPRT**

SEQ ID NO: 34 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada núm. 60

1 QVQLQQSGPG ILQPSQTLISL TCSFSGFSLI TSNMGVGVIR QPSGKGLEWL AHIWDDDKR  
61 YNPALKSRIT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYFCARI GRPTMITTWY LDVWGAGTTV  
121 TVSS

SEQ ID NO: 35 Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada núm. 60

1 DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASENLY SNLAWYQQKQ GKSPQLLVYA ATKLADGVPS  
61 RFGSGSGTQ YSLKINSLQS EDFGNYYCQH FWNTPYTFGG GTKLEIKR

## ES 2 784 616 T3

**Regiones determinantes de la complementariedad (CDR)** de anticuerpo anti-C2 del complemento humano de ratón num. 60 SEQ ID NO: 36-41

SEQ ID NO: 36 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada núm. 60

**TSNMGVG**

SEQ ID NO: 37 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada núm. 60

**HIWWDDDKRYNPALKS**

SEQ ID NO: 38 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada núm. 60

**IGRPTMITTWYLDV**

SEQ ID NO: 39 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera núm. 60

**RASENIYSNLA**

SEQ ID NO: 40 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera núm. 60

**AATKLAD**

SEQ ID NO: 41 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera núm. 60

**QHFWNTPYT**

SEQ ID NO: 42 Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humana núm. 5F2.4 quimérica

```
1 ATGGAATGGA GCGGCGTGTT CATGTTCCIG CTGTCCGTGA CCGCGGGAGT GCACAGCGAG
61 GTGCAGCTGC AGCACTCTGG AGCTGAGCIG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GAACATATCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTCACTGAC TACAACATGG ACTGGGTGAA ACACAGCCAT
181 GGAAGAGACC TTGACTGGAT TGGAGATAIT AATCCTAATT ATGAAAGTAC TGGGTACAAC
241 CAGAAGTTCA AGGAAAACGC CACATGACT GTTGACAAGT CCTCCAGCAC AGCCTACATG
301 GAACTCCGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCAGTCTATT ACTGTGCAAG AGAGGATGAT
361 CACGACGCCT TTGCTTACTG GGGCCAAGGG ACTCTGGTCA CTGTCTCTGC AGCTAGCACC
421 AAGGGCCCTT CCGTCTTTCC TCTGGCCCTT TGCTCCAGAT CCACCTCCCA GTCTACCGCC
481 GCTCTGGGCT GCCTCGTCAA GGACTACTTC CCCGAGCCCG TGACAGTGTC TTGGAACCTT
541 GGCGCCCTGA CCTCCGGCGT GCACACATTT CCAGCTGTGC TGACAGTCTC CGGCCTGTAC
601 TCCCTGTCTT CCGTCGTGAC TGTGCCTTCC TCTAGCCTGG GCACCAAGAC CTACACCTGT
661 AACCTGCACC ACAACCCCTC CAACACCAAG CTGCACAAGC CCCTCCAATC TAACTACGCC
721 CCTCCTTGCC CACCCTGCCC TGCCCTGAA TTTCTGGGCG GACCTTCCCT GTTCTGTITT
781 CCCCCAAAGC CCAAGGACAC CCTGATGATC TCCCGGACCC CCGAAGTGAC CTGCGTGGTG
841 CTCGATCTCT CCCACCAACA TCCCCAGCTC CACTTCAATT GCTACCTCCA CCCCCTCCAA
901 GTGCACAACG CCAAGACCAA GCCCAGAGAG GAACAGTTCA ACTCCACCTA CCGGTGGGTG
961 TCCGTGCTGA CCGTCTCTCA CCAGGATTGG CTGAACGGCA AAGAGTACAA GTGCAAGGTG
1021 TCCAACAAGG GCCTGCCCTC CAGCATCGAA AAGACCATCT CCAAGGCCAA GGGCCAGCCC
1081 CGGGAACCCC AGGTGTACAC ACTGCCTCCA AGCCAGGAAG AGATGACCAA GAACAGGTG
1141 TCCCTGACCT GTCTCGTCAA AGGCTTCTAC CCCTCCGATA TCGCCGTGGA ATGGGAGTCC
1201 AACGGCCAGC CTGAGAACAA CTACAAGACC ACCCCCCTCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC
1261 TCTTCTCTGT ACTCTGCCTT GACCGTGGAC AAGTCCCGGT GGCAGGAACG CAACGTGTTT
1321 TCCTGCTCTG TGATGCACGA GGCCCTGCAC AACCCTACA CCCAGAAGTC CCTGTCCCTG
1381 TCTCTGGGCA AG
```

SEQ ID NO: 43 Secuencia de ADNc que codifica la cadena kappa humana núm. 5F2.4 quimérica

```
1 ATGGAATGGA GCGGCGTGTT CATGTTCCIG CTGTCCGTGA CCGCGGGAGT GCACAGCGAG
61 ATGTGCTGTA CACAGTCTCC TGCTTCCGTA GTTGATCTC TGGGGCAGAG GGCCACCATC
```

# ES 2 784 616 T3

```

121 TCATGCAGGG CCAGCAAAAG TGTCAGAACA TCTGGCTATA ATTATATGCA CTGGTACCAA
181 CAGAAAACCAG GACAGCCACC CAAACTCCTC ATCTATCTTG CATCCAACTT AAAATCTGGG
241 GTCCCTGCCA GGTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACAGACT TCACCCTCAA CATCCATCCT
301 GTGGAGGAGG CCGATCCTGC AACCTATTAC TGTAGCACA GTAGGGAGCT TCCGTACACG
361 TTCGGAGGGG GGACCAAGCT GGAATAAAA CGGACCGTAG CCGCCCTTC CGTGTTCATC
421 TTCCACCCT CCGACGAGCA GCTGAAGTCT GGCACCGCTT CCGTCGTGTG CCTGTGAAC
481 AACTTCTACC CCCGCCAGGC CAAGGTGCAG TGAAGGTGG ACAACGCCCT GCAGTCCGGC
541 AACTCCCAGG AAAGCCTGAC CGAGCAGGAC TCCAAGGACA GCACCTACTC CCTGTCTCC
601 ACCCTGACCC TGTCCAAGGC CGACTACGAG AAGCACAAGG TGTACGCCCTG CGAAGTGACC
661 CACCAGGGCC TGTCTAGCCC CGTGACCAAG TCTTTCAACC GGGCGAGTG C

```

**SEQ ID NO: 44 Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humana núm. 13 quimérica**

```

1 ATCCAATCCA CCCCCTCTT CATCTTCTC CTCTCCCTGA CCCCCCACT CCACACTCAC
61 GTCCAACCTGC AGCAGCCTGG GGCTGAACTG GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GAAGTTGTCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTACCATC TACTATATGT ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT
181 GGACAAGGCC TTGAGTGGAT TGGGGAGGTT GATCCTAGCA TTGGTGGTAT TAGCTTCAAT
241 GAGAAGTTCA AGAGCAAGGC CACTGACT GTAGACAGAT CCTCCAGCAC AGCATAATG
301 CACTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTACAAG AAGTGGGACG
361 TACTATGCTA TGGACTACTG GGGTCAAGGA ACCTCAGTCA CCGTCTCCTC AGCTAGCACC
421 AAGGGCCCTT CCGTCTTTC TCTGGCCCTT TGCTCCAGAT CCACCTCCGA GTCTACCGCC
481 GCTCTGGGCT GCCTCGTGAA GGACTACTTC CCCGAGCCCG TGACAGTGTG TTGAACTCT
541 GCGGCCCTGA CCTCCGGCGT GCACACATTT CCAGCTGTGC TGACAGTCTC CCGCCTGTAC
601 TCCCTGTCTT CCGTCTGAC TGTGCCTTCC TCTAGCCTGG GCACCAAGAC CTACACCTGT
661 AACGTGGACC ACAACCCCTC CAACACCAAG GTGGACAAGC GGGTGGAAATC TAAGTACGGC
721 CCTCCTTGCC CACCCTGCC TGCCCTGAA TTTCTGGCG GACCTTCCGT GTTCTGTTT
781 CCCCCAAAGC CCAAGGACAC CCTGATGATC TCCCGACCC CCGAAGTGAC CTGCGTGGTG
841 GTGGATGTGT CCCAGGAAGA TCCCGAGGTG CAGTTCAATT GGTACGTGGA CCGCGTGGAA
901 GTGCACAACG CCAAGACCAA GCCCAGAGAG GAACAGTTCA ACTCCACCTA CCGEGTGGTG
961 TCCGTGCTGA CCGTCTGCA CCAGGATTGG CTGAACGGCA AAGAGTACAA GTGCAAGGTG
1021 TCCAACAAGG GCCTGCCCTC CAGCATCGAA AAGACCTCT CCAAGGCCAA GGGCCAGCCC
1081 CGGGAACCCC AGGTGTACAC ACTGCCTCCA AGCCAGGAAG AGATGACCAA GAACCAGGTG
1141 TCCCTGACCT GTCTCGTGAA AGGCTTCTAC CCTCCGATA TCGCCGTGGA ATGGGAGTCC
1201 AACCCCAACC CTCACAACAA CTACAAGACC ACCCCCTCTC TCTCCACTC CCACCCCTCC
1261 TTCTTCTGT ACTCTGCCT GACCGTGGAC AAGTCCCGGT GGCAGGAAG CAACGTGTTT
1321 TCTGTCTGTG TGATCCACGA GGCCCTGCAC AACCACTACA CCCAGAAGTC CCTGTCCCTG
1381 TCTCTGGGCA AG

```

**SEQ ID NO: 45 Secuencia de ADNc que codifica la cadena kappa humana núm. 13 quimérica**

```

1 ATGGAATGGA GCGGCGTGTT CATGTTCTTG CTGTCCGTGA CCGCGGGAGT GCACAGCGAT
61 GTCTCATGA CACAAACGCC TCTCTCCCTG CCTGTCTAGT TTGGAGATCA AGCCTCCATC
121 TCTTGACAG CTGGTCTAG CATTGTACAT AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC
181 CTGCAGAAAC CAGGCCAGTC TCCAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCAA CCGATTTTCT
241 GGGGTCCCAG ACAGGTTTCT TGGCAGTGGT TCAGGGACAG ATTTACACT CAAGATCAGC
301 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCTTTC AGGGTTCACA TGTTCGGTGG
361 ACGTTCGGTG GAGGCACCAA GCTGGAAATC AAACGGACCG TAGCCGCCCTT TCCCTGTTC
421 ATCTTTCCAC CCTCCGACGA GCAGCTGAAG TCTGGCACCG CTTCCTGCTG GTGCCCTGCTG
481 AACAACTTCT ACCCCGCGA GGCCAAGGTG CAGTGGAAAG TGGACAACGC CCTGCACTCC
541 GGCAACTCCC AGGAAAGCGT GACCCAGCAG GACTCCAAG ACAGCACCTA CTCCCTGTCC
601 TCCACCCTGA CCTGTCTCAA GGCCGACTAC GACAAGCACA AGGTGTACGC CTGCCAAGTG
661 ACCCACCAGG GCCTGTCTAG CCCCCTGACC AAGTCTTTCA ACCGGGGCGA GTGC

```

## ES 2 784 616 T3

**SEQ ID NO: 46 Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humana núm. 32 quimérica**

```

1  ATGGAATGGA GCGGCGTGTT CATGTTCCCTG CTGTCCGTGA CCGCGGGAGT GCACAGTCAG
61  GTGCAGCTGC AGCACTCTGG CGCCGAGCTG GTGAAACCTG GCGCCTCCGT GAAGCTGTCC
121 TGCAAGGCCCT CCGGCTACAC CTTACCAGC TACGACATGT ACTGGGTGAA ACACGGCCCT
181 GGCAGGGGCC TGAATGGAT CCGCGAGATC AACCCCTCCA ACGGCGACAC CAACTTCAAC
241 GAGAAGTTCA AGTCCAAGGC CACCCTGACC GTGGACAAGT CCTCCTCCAC CGCCACATG
301 CAGCTGTCCCT CCCTCACCTC CGAGGACTCC GCCGTGTACT ACTGCACCAG AGGCGGCACC
361 TTCTACGCTA TGGACTACTG GGGCCAGGGC ACCTCCGTGA CCGTGTCCCT TGCTAGCACC
421 AAGGGCCCCCT CCGTCTTTCC TCTGGCCCCT TGCTCCAGAT CCACCTCCGA GTCTACCGCC
481 GCTCTGGGCT GCCTCGTGAA GGACTIONT CCGGAGCCCG TGACAGTGTG TTGGAAGTCT
541 GCGGCCCTGA CCTCCGGCGT GCACACATTT CCAGCTGTGC TGCAGTCTTC CGGCCTGTAC
601 TCCCTGTCCCT CCGTCTGTAC TGTGCCTTCC TCTAGCCTGG GCACCAAGAC CTACACCTGT
661 AACGTGGACC AACAGCCCTC CAACACCAAG GTGGACAAGC GGGTGGAAAT TAAGTACGGC
721 CCTCCTTGCC CACCCTGCC TGGCCCTGAA TTTCTGGGCG GACCTTCCGT GTTCTCTTTT
781 CCCCCAAGC CCAACGACAC CCTGATGATC TCCCGSACCC CCAAGTGAC CTGCGTGTG
841 GTGGATGTGT CCCAGGAAGA TCCCGAGGTG CAGTTCAATT GGTACGTGGA CCGCGTGGAA
901 GTGCACAACG CCAACACCAA GCCCAGAGAG GAACAGTCA ACTCCACCTA CCGGTGTGTG
961 TCCGTGTCTGA CCGTCTGTGA CCAGGATTGG CTGAACGGCA AAGAGTACAA GTGCAAGGTG
1021 TCCAACAAGG GCCTGCCCTC CAGCAATGAA AAGACCATCT CCAAGGCCAA GGGCCAGCCC
1081 CGGGAACCCC AGGTCTACAC ACTGCCTCCA AGCCAGGAAG AGATGACCAA GAACCAGGTG
1141 TCCCTGACCT GTCTCGTGAA AGGCTTCTAC CCCTCCGATA TCGCCGTGGA ATGGAGTCTC
1201 AACGGCCAGC CTGACAACAA CTACAAGACC ACCCCCCCTG TCGTGGACTC CGACGGCTCC
1261 TTCTTCTGT ACTCTCGCCT GACCGTGGAC AAGTCCCGGT GGCAGGAAGG CAACGTCTTC
1321 TCCTGTCTG TGATGCACGA GGCCTGCAC AACCACTACA CCCAGAAGTC CCTGTCCCTG
1381 TCTCTGGCA AG

```

**SEQ ID NO: 47 Secuencia de ADNc optimizada para CHO que codifica la cadena de IgG1 humana núm. 32 quimérica**

```

1  ATGGAGTGGT CCGGCGTGTT CATGTTCCCTG CTGTCCGTGA CCGCTGGCGT GCACTCCAG
61  GTGCAGCTGC AGCACTCTGG CGCCGAGCTG GTGAAACCTG GCGCCTCCGT GAAGCTGTCC
121 TGCAAGGCCCT CCGGCTACAC CTTACCAGC TACGACATGT ACTGGGTGAA ACACGGCCCT
181 GGCAGGGGCC TGAATGGAT CCGCGAGATC AACCCCTCCA ACGGCGACAC CAACTTCAAC
241 GAGAAGTTCA AGTCCAAGGC CACCCTGACC GTGGACAAGT CCTCCTCCAC CGCCACATG
301 CAGCTGTCCCT CCCTCACCTC CGAGGACTCC GCCGTGTACT ACTGCACCAG AGGCGGCACC
361 TTCTACGCTA TGGACTACTG GGGCCAGGGC ACCTCCGTGA CCGTGTCCCT TGCTAGCACC
421 AAGGGCCCCCT CCGTCTTTCC TCTGGCCCCT TCCAGCAAGT CCACCTCTGG CGGCACCGCT
481 GCCCTGGGCT GCCTCGTGAA AGACTACTTC CCGGAGCCTG TGACAGTGTG CTGGAAGTCT
541 GCGGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCTGCCGTGC TGCAGTCTTC CGGCCTGTAC
601 TCCCTGTCCA GCGTCTGTAC AGTGCCTTCC TCCAGCCTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC
661 AACGTGAACC ACAACCCCTC CAACACCAAG GTGGACAAGA AGGTGGAACC CAACTCCTGC
721 GACAAGACCC ACACCTGTCC CCCCTGCCCT GCCCCTGAAC TCGTGGGCGG ACCTTCCGTG
781 TTCTGTCTCC CCCCCAAGCC TAAGGACACC CTGATGATCT CCGGACCCC CGAAGTGACC
841 TCGTGTGTGG TGGACGTGTC CCACGAGGAC CCTGAAGTGA AGTTCAATTG CTACGTGAC
901 GCGGTGGAAG TGACAACGC CAAGACCAAG CCCAGAGAGG AACAGTACAA CTCCACCTAC
961 CCGGTGTGTG CCGTCTGTAC CGTGTCTGC CAGGACTGGC TGAACGGCAA AGACTACAAG
1021 TGCAAGGTGT CCAACAAGGC CCTGCCTGCC CCCATCGAAA AGACCATCTC CAAGGCCAAG
1081 GGCAGCCCC GCGACCCCCA GGTGTACACC CTGCCCCCTA GCCGGGACGA GCTCACCAAG
1141 AACAGGTGT CCTCACCTG TCTGGTGAAG GGCTTCTACC CCTCCGATAT CGCCGTGGAA
1201 TGGAGTCCA ACGGCCAGCC CGAGAACAAC TACAAGACCA CCCCCCTGT GCTEGACTCC
1261 GACGGCTCAT TCTTCTGTG CTCCAAGCTG ACAGTGGATA AGTCCCGGTG GCACGAGGGC
1321 AACGTGTTCT CTGTCTCCGT GATGCACGAG GCCCTGCACA ACCACTACAC CCAGAAGTCC
1381 CTGTCCCTGA GCCCCGGCAA G

```

## ES 2 784 616 T3

SEQ ID NO: 48 Secuencia de ADNc optimizada para CHO que codifica la cadena kappa humana núm. 32 quimérica

```
1 ATGCAGTGGT CCGGCCTGTT CATGTTCCCTG CTGTCCCTGA CCGCTGGCGT GCACTCGGAC
61 ATCCAGATCA CCCAGACCCC CCTGTCCCTG CCCGTGTCTC TCCCGGACCA GGCCTCCATC
121 TCCTGCCGGT CCTCCAGTC CATCGTGCAC TCCAACGGCA ACACCTACCT GGAATGSTAT
181 CTGCAGAAGC CCGGCCAGTC CCCCAAGCTG CTGATCTACA AGGTGTCCAA CCGGTTCTCC
241 GGCCTGCCCG ACAGATCTCT CCGCTCCGGC TCTGGCACCG ACTTCACCCT GAAGATCTCC
301 CGGGTGGAAG CCGAGGACCT GGGCGTGTAC TACTGTTTTT AGGGCTCCCA CGTGCCCTGG
361 ACCTTCGGCG GAGGCACCAA GCTGAAAATC AAGCGGACCG TGGCCGCTCC CTCCGTGTTC
421 ATCTTCCCAC CCTCCGACGA GCAGCTGAAG TCCGGCACCG CCTCCGTGGT GTGCGTCTG
481 AACCAACTTCT ACCCCCGCGA GGCCAAGGTG CAGTGGAAAG TGGACAACGC CTGCACTCC
541 GGCAACTCCC AGGAATCCGT CACCGAGCAG GACTCCAAGG ACAGCACCTA CTCCCTGTCC
601 TCCACCCTGA CCCTGTCCAA GGCCGACTAC GAGAAGCACA AGGTGTACGC CTGCCAAGTG
661 ACCCACCAGG GCCTGTCCAG CCCCGTGACC AAGTCCCTCA ACCG3GGCGA GTGC
```

SEQ ID NO: 49 Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humana núm. 35 quimérica

```
1 ATCGAATGGA GCGGCCTGTT CATGTTCCCTG CTGTCCCTGA CCGCGGGAGT GCACASTCAG
61 GTCCAGCTGC AGCACTCTGG GGCAGAGCTT GTGAGGTGAG GGCCTCAGT CAACTGTGTC
121 TGCACAGCTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC TACTATATGC ACTGGGTGAA GCACAGGCCT
181 GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGATGGATT GATCCTGAGA ATG3TGATAC TGAATATGCC
241 CCCAAGTTCC AGGGCAAGGC CACTATGACT GCAGACACGT CCTCCAACAC AGCCTACCTG
301 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTAATTG GGAAAAATTC
361 TATGCTATGG ACGACTGGGG TCAAGGAACC TCAGTCACCG TCTCCTCAGC TAGCACCAAG
421 GGCCCTCCCG TGTTTCTCTT GGCCCTTTCG TCCAGATCCA CCTCCGAGTC TACCGCCGCT
481 CTGGGCTGCC TCGTGAAGGA CTACTTCCCC GAGCCCGTGA CAGTGTCTTG GAACTCTGGC
541 GCCCTGACCT CCGGCGTGCA CACATTTCCA GCTGTGCTGC ACTCCTCCGG CCTGTACTCC
601 CTGTCTCCG TCGTCACTGT GCCTTCTCTT AGCCTGGGCA CCAAGACCTA CACTCTAACC
661 GTGGACCACA AGCCCTCCA CACCAAGGTG GACAAGCGGG TGGAACTAA GTACGGCCCT
721 CCTTGCCAC CCTGCCCTGC CCTGAATTT CTGGGCGGAC CTTCCGTGTT CTCTTTCC
781 CCAAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCTCC CGGACCCCGG AAGTGACCTG CGTGTGGTG
841 GATGTGTCCC AGGAAGATCC CGAGGTGCAG TTCAATTGGT ACGTGGACGG CGTGAAGTG
901 CACAAGCCCA AGACCAAGCC CAGAGAGGAA CAGTTCAACT CCACCTACCG GGTGTGTGTC
961 GTCTGACCG TGCTECACCA GGATTGGCTG AACCGCAAAG AGTACAAGTG CAAGGTGTCC
1021 AACAAAGGCC TGCCCTCCAG CATCGAAAAG ACCATCTCCA AGCCCAAGGG CCAGCCCCGG
1081 GAACCCAGG TGTACACACT GCCTCCAAGC CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC
1141 CTGACCTGTC TCGTGAAGG CTTCTACCC TCCGATATCG CCGTGGAAATG GGAGTCCAAC
1201 GGCCAGCCTG AGAACAATA CAAGACCACC CCCCCTGTGC TGGACTCCGA CCGCTCCTTC
1261 TTCTGTACT CTCGCCTGAC CGTGGACAAG TCCCGGTGGC ACGAAGGCAA CGTGTCTTCC
1321 TGCTCTGTGA TGCACGAGG CCTGCACAAC CACTACACC AGAAGTCCCT GTCCCTGTCT
1381 CTGGGCAAG
```

SEQ ID NO: 50 Secuencia de ADNc que codifica la cadena kappa humana núm. 35 quimérica

```
1 ATGCAATGGA GCGGCCTGTT CATGTTCCCTG CTGTCCCTGA CCGCGGGAGT GCACAGCGAC
61 ATTGTGATGT CACAGTCTCC ATCCTCCCTA GCTGTGTGAG TCGGAGAGAA GGTACTATG
121 AGCTGCAAGT CCAGTCAGAG CCTTTTATAT AGTAGCAATC AAAA3AATA CTGGCCCTGG
181 TACCAGCAGA AACCAGGGCA GTCTCC1AAA C1ACTGATTT ACTGGGCATC CACTAGGGAA
241 TCTGGGGTCC CTGATCGCTT CACAGGCAGT GGATCTGGGA CAGATTTTAC TCTCACCATC
301 AGCAGTGTGA AGGCTGAAGA CCTGGCAGTT TATTACTGTC AGCAATATTA TAGCIATCCT
361 CGGACSTTCG GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAACGGA CCGTAGCCGC CCCTTCCGTG
421 TTCATCTTTC CACCCTCCGA CGAGCAGCTG AAGTCTGGCA CCGCTTCCGT CGTGIGCCTG
481 CTGAACAAC TCTACCCTCC GAGGGCAAG GTGCAGTGGG AGGTGGACAA CGCCCTGCAG
541 TCCGGCAACT CCCAGAAAAG CGTGACCGAG CAGGACTCCA AGGACAGCAC C1ACTCCCTG
601 TCCTCCACCC TGACCCTGTC CAAGGCCGAC TACGAGAAGC ACAAGGTGTA CGCCTGCGAA
```

## ES 2 784 616 T3

661 CTCACCCACC ACCCCCTCTC TACCCCCCTC ACCAAGTCTT TCAACCCGCC CCACTCC

### SEQ ID NO: 51 Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humana núm. 60 quimérica

1 ALCGAATGCA CCGCCCTCTT CATCTTCTC CTGTCCCTGA CCGCCGAGT CCACAGCCAG  
61 GTGCAGCTGC AGCACTCTGG CCCTGGGATT TTGCAGCCCT CCCAGACCCT CAGTCTGACT  
121 TGTTCTTTCT CTGGCTTTTC ACTGAGCACC TCTAATATGG GTGTAGGCTG GATTCTGTCAG  
181 CCTTCAGGGA AGGGTCTGGA GTGGCTGGCA CACATTGGT GGGATGATGA CAAGCGCTAT  
241 AATCCAGCCC TGAACAGCCG ACTGACAATC TCCAAGGATA CCTCCAGCAA CCAGGTATTC  
301 CTCAAGATCG CCAGTGTGGA CACTGCAGAT ACTGCCACAT ACTTCTGTGC TCGAATAGGC  
361 CGACCTACTA TGATTACGAC GTGGTACCTC GATGTCTGGG GCGCAGGGAC CACGGTCACC  
421 GTCTCTCAG CTAGCAACAA GGGCCCTCC GTGTTTCTC TGGCCCTTG CTCCAGATCC  
481 ACCTCCGAGT CTACCGCCGC TCTGGGCTGC CTCGTGAAGG ACTACTTCCC CGAGCCCGTG  
541 ACAGTGTCTT GGAACCTCTG CGCCCTGACC TCCGGCGTGC ACACATTTCC AGCTGTGCTG  
601 CAGTCTCCG GCCTTACTC CCTGTCTCC GTCGTGACTG TGCCTTCTC TAGCCTGGGC  
661 ACCAAGACCT ACACCTGTAA CGTGGACCAC AAGCCCTCCA ACACCAAGGT GGACAAGCGG  
721 GTGGAATCTA AGTACGGCCC TCCTTGCCCA CCCTGCCTG CCCCTGAATT TCTGGGCGGA  
781 CCTTCCGTGT TCCTGTTTCC CCCAAAGCCC AAGGACACCC TGATGATCTC CCGACCCCC  
841 GAAGTGACCT GCGTGTGGT GGATGTGTCC CAGGAAGATC CCGAGGTGGA GTTCAATTGG  
901 TACGTGGACG GCGTGAAGT GCACAACGCC AAGACCAAGC CCAGAGAGGA ACTTCAAC  
961 TCCACCTACC GGGTGTGTCT CGTGTGACC GTGCTGCACC AGGATTGGCT GAACGGCAAA  
1021 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAGGGC CTGCCCTCCA GCATCGAAAA GACCATCTCC  
1081 AAGGCCAAGG GCCAGCCCCG GGAACCCAG GTGTACACAC TGCCTCAAG CCAGGAAGAG  
1141 ATGACCAAGA ACCAGGTCTC CCTGACCTGT CTCGTGAAAG GCTTCTACCC CTCCGATATC  
1201 CCCCTCCAAT CCCACTCAA CCCCCACCCT CACAACAAC ACAAACACCAC CCCCCCTCTC  
1261 CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTGTAC TCTCGCTGA CCGTGGACAA GTCCCGGTGG  
1321 CAGGAAGGCA ACGTCTCTC CTGCTCTGTG ATGCACGAGG CCCTGCACAA CCACTACACC  
1381 CAGAAGTCCC TGTCCCTCTC TCTGGGCAAG

### SEQ ID NO: 52 Secuencia de ADNc que codifica la cadena kappa humana núm. 60 quimérica

1 ATGGAATGGA GCGGCTGTG CATGTTCTC CTGTCCCTGA CCGCGGGAGT GCACAGCGAC  
61 ATCCAGATGA CTCAGTCTCC AGCCTCCCTA TCTGTATCTG TGGGAGAAAC TGTACCATC  
121 ACAATGTGAG CAAGTGAGAA TATTACAGT AATTTAGCAT GGATCAGCA GAAACAGGGA  
181 AAATCTCCTC AGCTCTGCT CTATGCTGCA ACAAAATAG CAGATGGTGT GCCATCAAGG  
241 TTCAGTGGCA GCGGATCAGG CACACAGTAT TCCCTCAAGA TCAACAGCCT CGAGTCTGAA  
301 GATTTTGGGA ACTATTACTG TCAACATTTT TGGAATACTC CGTACACGTT CCGAGGGGGG  
361 ACCAAGCTGG AAATAAAACG GACCGTAGCC GCCCCTCCG TGTTCATCTT TCCACCCTCC  
421 GACGAGCAGC TGAAGTCTGG CACCGCTCC GTCGTGTGCC TGCTGAACAA CTCTACCCC  
481 CGCGAGGCCA AGGTGCAGTG GAAGGTGGAC AACGCCCTGC AGTCCGGCAA CTCCAGGAA  
541 AGCGTGACCG AGCAGGACTC CAAGGACAGC ACCTACTCCC TGTCTCCAC CCTGACCCTG  
601 TCCAAGGCCG ACTACCAGAA GCACAAGGTG TACGCTCGG AAGTGACCCA CCAGGGCCTG  
661 CTAGCCCCG TGACCAAGTC TTCAACCGG GCGGAGTGC

### SEQ ID NO: 53 Secuencia de aminoácidos de la cadena de IgG4 humana núm. 5F2.4 quimérica

MEWSCVFMFLSVTAGVHSEVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYIFTD  
YNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM  
ELRSLTSEDVAVYYCAREDDHDAFAYWCQCTLVTVSAASTKGPSVFLPLP  
CSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY  
SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPE  
FLGGPSVFLFPPKPDTLMSRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  
KTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH

## ES 2 784 616 T3

NHYTQKSLSLSLGK

**SEQ ID NO: 54 Secuencia de aminoácidos de la cadena kappa humana núm. 5F2.4 quimérica**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHSDIVLTQSPASVVVSLGQRATISCRASKSVRT  
SGYNYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLKSGVPARFSGSGSGTDFTLNIHP  
VEEADAATYYCQHSRELPYTFGCCTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS  
TLTSLKADYEKHKVYACEVTEQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 55 Secuencia de aminoácidos de la cadena de IgG4 humana núm. 13 quimérica**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHSQVQLQPGAEVLPKPGASVKLSCKASGYFTTI  
YYMYVWKQRPGGLEWIGEVDPSIGGISFNEKFKSKATLTVDRSSSTAYM  
HLSSLTSEDSAVYYCTRGTTYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY  
SLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSLGK

**SEQ ID NO: 56 Secuencia de aminoácidos de la cadena kappa humana núm. 13 quimérica**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHSDVLMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRAGQSIVH  
SNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDLGVIYCFQGSHPVWTFGGCTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS  
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 57 Secuencia de aminoácidos de la cadena de IgG4 humana núm. 32 quimérica**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAEVLPKPGASVKLSCKASGYFTTS  
YDMYVWKQRPGGLEWIGEINPNSGDTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAHM  
QLSSLTSEDSAVYYCTRGTFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY  
SLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE  
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH  
NHYTQKSLSLSLGK

**SEQ ID NO: 58 Secuencia de aminoácidos la cadena de IgG1 humana núm. 32 quimérica**

MEWSGVFMFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAEVLPKPGASVKLSCKASGYFTTS  
YDMYVWKQRPGGLEWIGEINPNSGDTNFNEKFKSKATLTVDKSSSTAHM  
QLSSLTSEDSAVYYCTRGTFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLY  
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA



## ES 2 784 616 T3

PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID NO: 59** Secuencia de aminoácidos de cadena kappa humana núm. 32 quimérica

MEWSGVFMFLSVTAGVHSDIQMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIYH  
SNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL  
SLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 63** Secuencia de aminoácidos de cadena de IgG4 humana núm. 35 quimérica

MEWSGVFMFLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRSASVSKLSCTASGFNIKD  
YYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPKFKGKATMTADTSSNTAYL  
QLSSLTSEDITAVYYCNWEKFYAMDDWGQTSVTVSSASTKGPSVFPPLAFC  
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEF  
LCGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDCVEV  
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  
HYTQKSLSLGLGK

**SEQ ID NO: 61** Secuencia de aminoácidos de cadena kappa humana núm. 35 quimérica

MEWSGVFMFLSVTAGVHSDIVMSQSPSSLAVSVGKVTMSCKSSQSLLY  
SSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI  
SSVKAEDLAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL  
KSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL  
SSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**SEQ ID NO: 62** Secuencia de aminoácidos de cadena de IgG4 humana núm. 60 quimérica

MEWSGVFMFLSVTAGVHSQVQLQQSGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLST  
SNMGVGVIRQPSGKGLEWLAH IWWDDDKRYNPALKSRLTI SKDTSSNQVF  
LKIASVDTADTATYFCARICRPTMITTWYLDVWCAGTTVTVSSASTKGPS  
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
LPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

**SEQ ID NO: 63** Secuencia de aminoácidos de cadena kappa humana núm. 60 quimérica

MEWSGVFMFLSVTAGVHSDIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYS  
NLAWYQQKQKSPQLLVYAATKLADGVPSRFRSGSGSGTQYSLKINSIQSE  
DFGNYYCQHFWNTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSITL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## ES 2 784 616 T3

**SEQ ID NO: 96** Secuencia de aminoácidos de ratón consenso de región variable de cadena ligera núm. 5F2.4

```
1  DNVLTQSPAS VVSLGQRAT ISCRASKSVR TSGYNYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLKS
61  GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVVEADAATY YCQHSRELPY TFGGGTKLEI KR
```

**SEQ ID NO: 97** Secuencia de aminoácidos de ratón consenso de región variable de cadena pesada núm. 35

```
1  EVQLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMHVVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDTEY
61  APKFQCKATM TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCNEWK FYAMDDWCQC TSVTVSS
```

**SEQ ID NO: 98** Secuencia de aminoácidos de ratón consenso de región variable de cadena pesada núm. 60

```
1  QVALKESGPG ILQPSQTLNL TCSFSGFSLT TSNMCGVWIR QPSGKGLEWL AHIWDDDKR
61  YNPALKSRLT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYFCARI GRPTMITTWY LDVWGAGTTY
121 TVSS
```

**SEQ ID NO: 99**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera VL1 anti-C2 5F2.4 humanizada

```
DNVLTQSPDSLVA1SLGERATISCRASKSVR2TSGYNYMHWYQQKPGQPPKL
LIYLASNLKSGV3PARFSGSGSGTDFTLTISS4LQEDAATY5YCQHSRELPY
TFGQGTKLEIK
```

**SEQ ID NO: 100**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera VL2 anti-C2 5F2.4 humanizada

```
DNVLTQSPDSLVA1SLGERATISCRASKSVR2TSGYNYMHWYQQKPGQPPKL
LIYLASNLKSGV3PARFSGSGSGTDFTLTISS4LQEDAATY5YCQHSRELPY
TFGQGTKLEIK
```

**SEQ ID NO: 101**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera VL3 anti-C2 5F2.4 humanizada

```
DNVLTQSPDSLVA1SLGERATISCRASKSVR2TSGYNYMHWYQQKPGQPPKL
LIYLASNLKSGV3PDFRSGSGSGTDFTLTISS4LQEDAATY5YCQHSRELPY
TFGQGTKLEIK
```

**SEQ ID NO: 102**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera VL4 anti-C2 5F2.4 humanizada

```
DNVLTQSPDSLVA1SLGERATINCRASKSVR2TSGYNYMHWYQQKPGQPPKL
LIYLASNLKSGV3PDFRSGSGSGTDFTLTISS4LQEDAATY5YCQHSRELPY
TFGQGTKLEIK
```

**SEQ ID NO: 103**

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada VH1 anti-C2 5F2.4 humanizada

```
EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTF1TDY2NMDWVKQAHGQGLEWIGD
INPNYESTGYNQ3FKGRATLTV4DKSISTAYMELRSLTSED5TAVYYCARED
DHDAFAYWGQGT6LVTVSS
```

# ES 2 784 616 T3

## SEQ ID NO: 104

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada VH2 anti-C2 5F2.4 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNMDWVKQATGQGLEWIGD  
INPNYESTGYNQKFKGRATLTVDKSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARED  
DHDAFAYWGQGLVTVSS

## SEQ ID NO: 105

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada VH3 anti-C2 5F2.4 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGD  
INPNYESTGYNQKFKGRATLTVNKSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARED  
DHDAFAYWGQGLVTVSS

## SEQ ID NO: 106

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada VH4 anti-C2 5F2.4 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGD  
INPNYESTGYNQKFKGRATMTVNKSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARED  
DHDAFAYWGQGLVTVSS

## SEQ ID NO: 107

Secuencia de ADNc que codifica la cadena ligera  $\kappa$  humanizada 5F2.4 que contiene VL1 humanizada

GACAACGTGCTGACCCAGTCCCTGACTCCCTGGTGGTGTCTCTGGGCGAGAGGCCACC  
ATCTCTTGCCGGGCTCTAAGTCCGTGCGGACCTCCGGCTACAACCTACATGCACTGGTAT  
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGAAGTCC  
GGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGC  
TCCCTGCAGGAAGAGGACGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGAGAGCTGCCCTAC  
ACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGAAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT  
ATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCCGTCGTGCTGCTG  
AACAACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC  
GGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC  
TCCACCTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTG  
ACCCACCAGGGCTGTCTAGCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGGAGTGC

## SEQ ID NO: 108

Secuencia de ADNc que codifica la cadena ligera  $\kappa$  humanizada 5F2.4 que contiene VL2 humanizada

GACAACGTGCTGACCCAGTCCCTGACTCCCTGGTGGTGTCTCTGGGCGAGAGGCCACC  
ATCTCTTGCCGGGCTCTAAGTCCGTGCGGACCTCCGGCTACAACCTACATGCACTGGTAT  
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGAAGTCC  
GGCGTGCCCGCCAGATTCTCCGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGC  
TCCCTGCAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGAGAGCTGCCCTAC  
ACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGAAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT  
ATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCCGTCGTGCTGCTG  
AACAACTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCC  
GGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCC

## ES 2 784 616 T3

TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCCAAGTG  
ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGGGAGTGC

**SEQ ID NO: 109**

**Secuencia de ADNc que codifica la cadena ligera  $\kappa$  humanizada 5F2.4 que contiene VL3 humanizada**

GACAACGTGCTGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACC  
ATCTCTTGGCCGGGCTCTAAGTCCGTGCGGACCTCCGGCTACAACCTACATGCACTGGTAT  
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGAAGTCC  
GGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCACCTTACCCTGACCATCAGC  
TCCCTGCAAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGAGAGCTGCCCTAC  
ACCTTTCCCCACGCCACCAACCTCGAAATCAACCCGACCCTGCCCGCTCCCTCCGTCTTC  
ATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCCCTCGTGTGCCTGCTG  
AACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCC  
GGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGCACAGCACCTACTCCCTGTCC  
TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGACAAGCACAACTCTACCCCTGCCAAGTC  
ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGGGAGTGC

**SEQ ID NO: 110**

**Secuencia de ADNc que codifica la cadena ligera  $\kappa$  humanizada 5F2.4 que contiene VL4 humanizada**

GACAACGTGCTGACCCAGTCCCCTGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACC  
ATCAACTGCCGGGCTCTAAGTCCGTGCGGACCTCCGGCTACAACCTACATGCACTGGTAT  
CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGAAGTCC  
GGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCACCTTACCCTGACCATCAGC  
TCCCTGCAAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCAGAGAGCTGCCCTAC  
ACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGCCGACCCTGGCCGCTCCCTCCGTGTTT  
ATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCCCTCGTGTGCCTGCTG  
AACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCC  
GGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGCACAGCACCTACTCCCTGTCC  
TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCCAAGTG  
ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGGGAGTGC

**SEQ ID NO: 111**

**Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH1 humanizada**

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGCGCCGAGCTGAAGAACTGGCGCCTCCGTGAAGATC  
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACAACATGGACTGGGTCAAGCAGGCC  
CACGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGACATCAACCCCACTACAGTCCACCGGCTAC  
AACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCATCTCCACCGCTAC  
ATGGAAGTGGGTCCCTGACCTCTGAGGACACCGCCGTGACTACTGCCCCAGAGAGGAC  
GACCACGACGCCTTTGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCSTGTCTCTGCTTCT  
ACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC

# ES 2 784 616 T3

GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC  
TCTGGCCCTCTCACCCTCCGGCTGCACACCTTTCCAGCTCTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTG  
TACTCCCTGTCCCTCCGTCTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC  
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACTCTAAGIAC  
GGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCAGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTG  
TTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCCTG  
GTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCCTG  
GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGCTG  
GTGTCCGTGCTGACCGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAG  
GTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG  
CCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG  
CTCTCCCTGCATCCCTCCTCAAAGCCTTCTACCCCTCCCATATCCCCCTCCAAATGCCAC  
TCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACCGC  
TCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACAGTGGATAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACCTG  
TTCTCCTGTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCCCTGICC  
CTGAGCCTGGGCAAG

SEQ ID NO: 112

Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH2 humanizada

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCCCTCCGTGAAGATC  
TCCTGCAAGCCCTCCGGCTACACCTTCAACCGACTACAACATGGACTGGGTCAAGCAGGCC  
ACCGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGACATCAACCCCAACTACGAGTCCACCGGCTAC  
AACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCTGACCGTGGACAAGTCCATCTCCACCGCTAC  
ATGAACTGTCTCCCTCCGAGCGAGGACACCGCCGIGTACTACTGCGCCAGAGAGCAC  
GACCACGACGCCTTTGCTTATTEGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCTGCTICT  
ACCAAGGGCCCTCCGTETTCCTCTGGCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC  
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAAC  
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTG  
TACTCCCTGTCCCTCCGTCTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC  
TCTAACCTGCACCACAACCCCTCCAACACCAAGCTGCACAAGCCGCTCGAATCTAAGIAC  
GGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCAGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTG  
TTCCCCCAAAGCCAAAGGACACCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCCTG  
GTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCCTG  
GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGCTG  
GTGTCCGTGCTGACCGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAG  
GTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG  
CCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG  
GTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG  
TCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACCGC  
TCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACAGTGGATAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACCTG  
TTCTCCTGTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCCCTGICC

# ES 2 784 616 T3

CTGTCTCTGGGAAAG

## SEQ ID NO: 113

Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH3 humanizada

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC  
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGGCT  
ACCGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGACATCAACCCCAACTACGAGTCCACCGGCTAC  
AACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCCTGACCCTGAACAAGTCCATCTCCACCGCTAC  
ATGGAAC1GTTCCTCCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTACTACTGCGCCAGAGAGGAC  
GACCACGACGCCTTTGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCCTGTCTCTGCTTCT  
ACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC  
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGAAC  
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG  
TACTCCCTGTCTCCGTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC  
TGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGTGGAATCTAAGTAC  
GGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCAGCCCC1GAATT1CTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTG  
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCC1GATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG  
GTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG  
GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC1AGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTG  
GTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACCAGGAT1TGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAG  
GTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG  
CCCCGGAAACCCAGGTGTACACACTGCC1CCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG  
GTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATC3CCGTGGAATGGGAG  
TCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGC  
TCCTTCTTCTGTACTCTCGGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTG  
TTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGTCCCTGTCC  
CTGTCTCTGGGAAAG

## SEQ ID NO: 114

Secuencia de ADNc que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH4 humanizada

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGGTG  
TCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTTACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGGCT  
ACCGGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCGACATCAACCCCAACTACGAGTCCACCGGCTAC  
AACCAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACCATGACCCTGAACAAGTCCATCTCCACCGCTAC  
ATGGAAC1GTTCCTCCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTACTACTGCGCCAGAGAGGAC  
GACCACGACGCCTTTGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCCTGTCTCTGCTTCT  
ACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACC  
GCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGAAC  
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTG  
TACTCCCTGTCTCCGTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACC

## ES 2 784 616 T3

TGTAACGTGGACCACAAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACTAAGTAC  
GGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCAGCGTGTTCCTG  
TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCAAGTGACCTGCCTG  
GTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG  
GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTG  
GTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAG  
GTGTCCAACAAGGGCCTGCCTTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG  
CCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG  
GTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG  
TCCAACGGCCAGCCTGAGAACACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACTCCGACGGC  
TCCTTCTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTG  
TTCTCCTCCTCCCTCATCCACCAGCCCTCCACAACCCTATACCCACAACCTCCCTCTCC  
CTGTCTCTGGGAAAG

### SEQ ID NO: 115

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena  $\kappa$  ligera humanizada 5F2.4 que contiene VL1 humanizada

DNVLTQSPDSLVLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLYLASNLKSGVPAFSGSGSGTD  
FTLTSSLQAEADAATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### SEQ ID NO: 116

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena  $\kappa$  ligera humanizada 5F2.4 que contiene VL2 humanizada

DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLYLASNLKSGVPAFSGSGSGTD  
FTLTSSLQAEADAATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### SEQ ID NO: 117

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena  $\kappa$  ligera humanizada 5F2.4 que contiene VL3 humanizada

DNVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLYLASNLKSGVPAFSGSGSGTD  
FTLTSSLQAEADAATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### SEQ ID NO: 118

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena  $\kappa$  ligera humanizada 5F2.4 que contiene VL4 humanizada

DNVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVRTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLYLASNLKSGVPAFSGSGSGTD  
FTLTSSLQAEADAATYYCQHSRELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

### SEQ ID NO: 119

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH1 humanizada

EVQLVQSGAELKKPGASVKISCKASGYTFDYNMHWYQQKPGQPPKLLYLASNLKSGVPAFSGSGSGTD  
SISTAYMELRSLTSEDYAVYYCAREDDHDAFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP  
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS

## ES 2 784 616 T3

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG  
K

### SEQ ID NO: 120

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH2 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNMDWVKQATGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATLTVDK  
SISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP  
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG  
K

### SEQ ID NO: 121

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH3 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATLTVNK  
SISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP  
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG  
K

### SEQ ID NO: 122

Secuencia de aminoácidos que codifica la cadena de IgG4 humanizada 5F2.4 que contiene VH4 humanizada

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFDYNMDWVRQATGQGLEWIGDINPNYESTGYNQKFKGRATMTVVK  
SISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDHDAFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP  
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG  
K



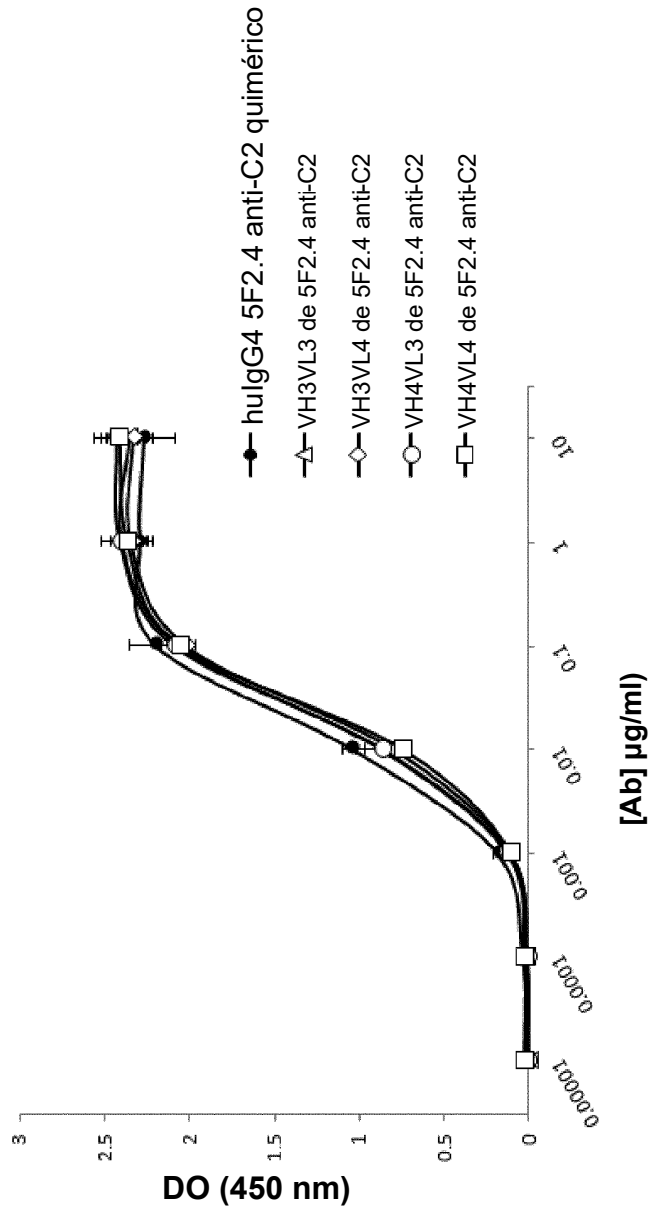
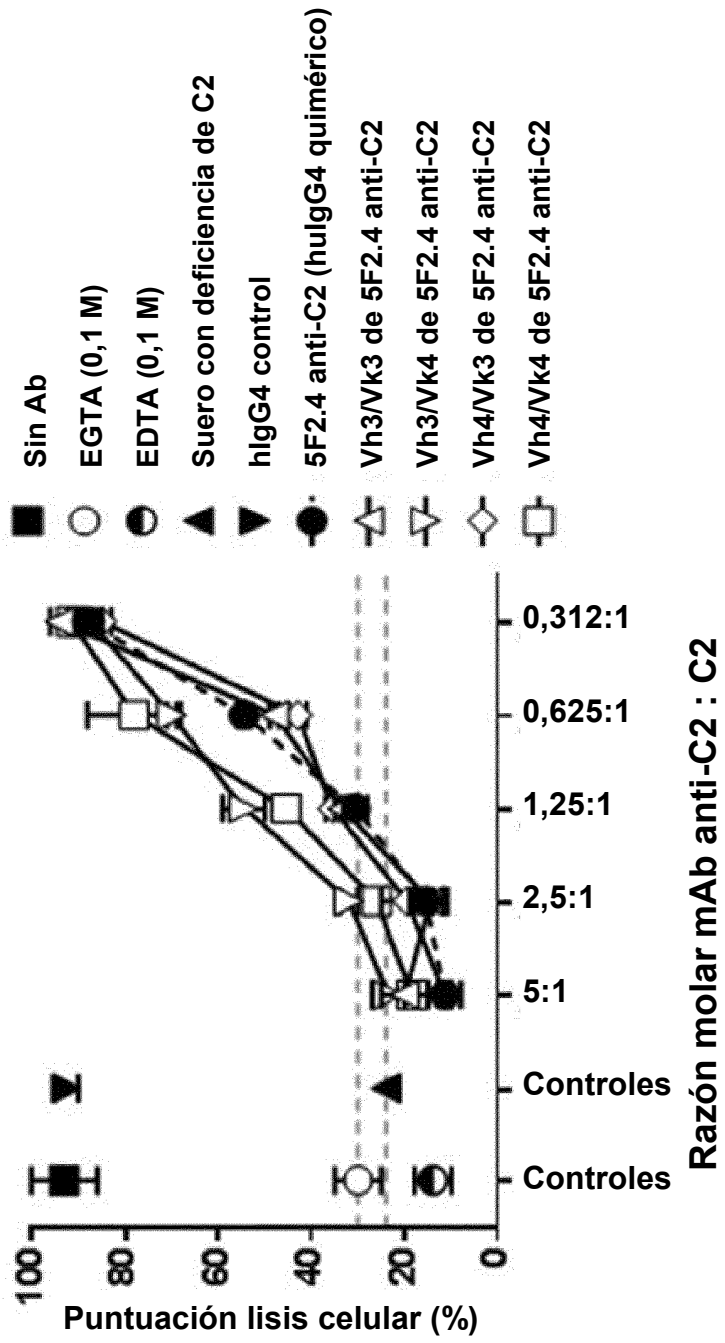


Figura 17

Figura 18



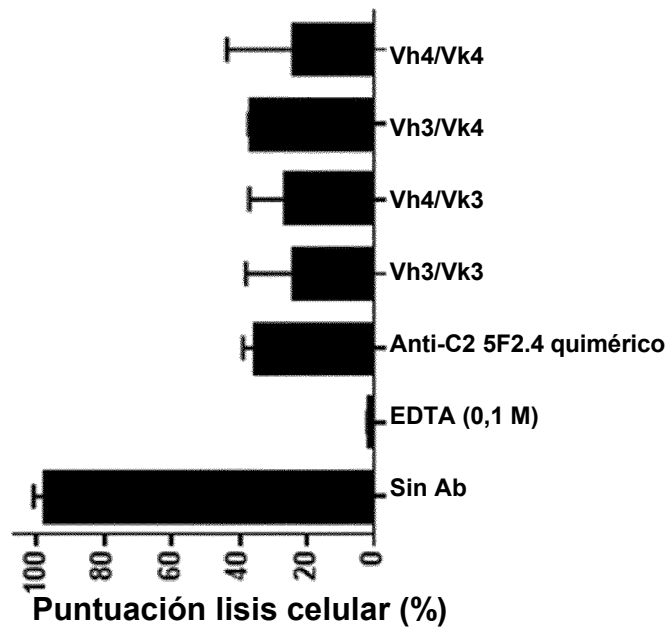


Figura 19