

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 165**

21 Número de solicitud: 201330452

51 Int. Cl.:

**C07K 16/42** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.03.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.10.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070236**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (85.0%)**

**SERRANO, 117**

**28006 MADRID ES y**

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (15.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, Santiago y  
DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, Mercedes**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **ANTICUERPO ANTI-FACTOR B, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ÚTIL PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL COMPLEMENTO Y SUS APLICACIONES**

57 Resumen:

Anticuerpo anti-factor B, composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades del complemento y sus aplicaciones.

La presente invención describe un anticuerpo anti-factor B que bloquea la generación de la convertasa del C3 de la vía alternativa útil para prevenir o modular la activación o amplificación de la activación del complemento. Una forma concreta de este anticuerpo es el anticuerpo monoclonal anti-factor B producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301. Además, proporciona una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades asociadas del complemento como por ejemplo, el síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) o la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). Igualmente, se proporciona un complejo biotecnológico útil para la realización de ensayos para la identificación y diseño de medicamentos o composiciones farmacéuticas inhibitoras del complemento.

ES 2 514 165 A1

**DESCRIPCIÓN**

**ANTICUERPO ANTI-FACTOR B, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL COMPLEMENTO Y SUS APLICACIONES**

5

**SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se circunscribe al sector de la biomedicina y, concretamente, al sector del tratamiento de pacientes con enfermedades causadas por alteraciones en el sistema del complemento, y más concretamente, en el desarrollo de inhibidores del complemento mediante herramientas biotecnológicas.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 El complemento es un componente fundamental de la inmunidad innata con papeles cruciales en la eliminación de los patógenos, en el aclaramiento de los restos apoptóticos, en el procesamiento de los inmunocomplejos y en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. El complemento funciona como un sistema de amplificación en cascada. Su activación se inicia por tres vías, la vía clásica, la vía de las lectinas y de la vía alternativa (AP), que convergen en el paso central y más importante de la activación del complemento: la rotura de C3 para generar el fragmento activado, C3b. El paso crítico en estas vías de activación es la formación de unos complejos bimoleculares inestables con actividad proteasa, denominados C3-convertasas (C3bBb en la AP). Cuando se genera C3b, se expone un tioéster reactivo, lo que resulta en la unión covalente de C3b a la superficie activadora. La unión de C3b marca esa superficie para su destrucción y localiza sobre ella el inicio de la inflamación. La eficacia de la cascada del complemento depende del bucle de amplificación que aporta la AP C3 convertasa, ya que el C3b generado por esta convertasa forma más AP C3-convertasa y proporciona una amplificación exponencial de la activación inicial.

20

25

30

La generación de la AP C3-convertasa comienza in vivo con la interacción entre C3b y el factor B (FB) para formar la AP C3 pro-convertasa (C3bB). En presencia de factor D (FD), FB se escinde en dos fragmentos Bb y Ba, liberándose este último del complejo C3bB, lo que resulta en la AP C3-convertasa activa, C3bBb. FB (90 kDa) circula como una proenzima inactiva en el plasma. Se compone de cinco dominios estructurales. Tres repeticiones consenso cortas (SCRs) en el extremo N-terminal comprenden el fragmento Ba, mientras

35

que Bb, el fragmento grande en el extremo C-terminal, se compone de un dominio von Willebrand de tipo A (vWA), seguido de un dominio serín-proteasa (SP).

La estructura cristalina del FB humano, resuelta recientemente a una resolución de 2,3 Å, ha  
 5 mostrado que el dominio Ba se extiende plegado sobre el dominio Bb [F.J. Milder, L. Gomes, A. Schouten, B.J.C. Janssen, E.G. Huizinga, R.A. Romijn, W. Hemrika, A. Roos, M.R. Daha, P. Gros, Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system, *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007) 224-228]. FB se une a C3b en esta conformación cerrada a través de interacciones que implican tanto al vWA, como a los  
 10 dominios SCR. Después de esta interacción inicial se produce un cambio conformacional en FB, abriéndose su estructura y exponiéndose el sitio de corte por FD. Tras la escisión por FD y la liberación del fragmento Ba, el complejo entre C3b y Bb en la AP C3-convertasa C3bBb se mantiene por las interacciones entre el C345C y el dominio vWA de Bb [F.J. Milder, L. Gomes, A. Schouten, B.J.C. Janssen, E.G. Huizinga, R.A. Romijn, W. Hemrika, A.  
 15 Roos, M.R. Daha, P. Gros, Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system, *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007) 224-228; S.H.M. Rooijackers, J. Wu, M. Ruyken, R. van Domselaar, K.L. Planken, A. Tzekou, D. Ricklin, J.D. Lambris, B.J.C. Janssen, J.A.G. van Strijp, P. Gros, Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor,  
 20 *Nat Immunol* 10 (2009) 721-727; E. Torreira, A. Tortajada, T. Montes, S. Rodriguez de Cordoba, O. Llorca, 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase, *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (2009) 882-887; E. Torreira, A. Tortajada, T. Montes, S. Rodriguez de Cordoba, O. Llorca, Coexistence of Closed and Open Conformations of Complement Factor B in the  
 25 Alternative Pathway C3bB(Mg<sup>2+</sup>) Proconvertase, *J Immunol* 183 (2009) 7347-7351; B.J.C. Janssen, L. Gomes, R.I. Koning, D.I. Svergun, A.J. Koster, D.C. Fritzing, C.-W. Vogel, P. Gros, Insights into complement convertase formation based on the structure of the factor B-cobra venom factor complex, *EMBO J* 28 (2009) 2469-2478].

30 En situaciones normales, la activación de C3 en la sangre se mantiene a un nivel bajo y la deposición de C3b y la posterior activación del complemento se limita a la superficie de los patógenos. En enfermedades inflamatorias, la activación desregulada del complemento puede dañar los componentes celulares propios y contribuir a la patología. De hecho, el complemento está implicado en una larga lista de enfermedades [V.M. Holers, The spectrum  
 35 of complement alternative pathway-mediated diseases, *Immunol Rev* 223 (2008) 300-316], incluyendo la artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis,

esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión. En cada una de estas enfermedades, el complemento perpetúa el "círculo vicioso" de la inflamación y exacerba el daño tisular. En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado que la desregulación del complemento es también un factor etiológico importante en varias enfermedades. Así, las glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3-GP), el síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) y la degeneración macular asociada a la edad (AMD) son ejemplos de enfermedades causadas por la desregulación del complemento como consecuencia de mutaciones o polimorfismos en los componentes o en las proteínas reguladores de la AP C3 convertasa [Rodríguez de Córdoba S., Tortajada A., Harris CL. And Morgan P. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. Immunobiology 217 (2012) 1034-46]. Hoy en día estos trastornos se consideran enfermedades prototípicas causadas por la desregulación del complemento.

Inhibir la formación de la AP C3 convertasa o disminuir su actividad sería un tratamiento eficaz para enfermedades en las que se produzca desregulación de la activación del complemento. Para ello los inventores han desarrollado un anticuerpo monoclonal (mAb) en ratón denominado FB-28.4.2 que realiza estas funciones. El mAb FB-28.4.2, sólo o en combinación con otros inhibidores de complemento, se presenta como un compuesto útil para el tratamiento de enfermedades en las que la desregulación de la AP del complemento es la causa etiológica o contribuye significativamente a la patogénesis.

## **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

### **Descripción Breve**

Un primer objeto de la invención lo constituye un anticuerpo anti-factor B que bloquea la generación de la convertasa del C3 de la vía alternativa útil para prevenir o modular la activación o amplificación de la activación del complemento, en adelante anticuerpo anti-factor B de la invención, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo en el fragmento Ba del factor B y cuya secuencia aminoacídica de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO1 y/o cuya secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica la SEQ ID NO4.

35

Un objeto preferente de la invención lo constituye el anticuerpo anti-factor B de la invención donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma.

5 Una realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención que está producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

10 Otra realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo anti-factor B de la invención constituido por un fragmento del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

15 Otro objeto de la invención es el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301, que se caracteriza por producir el anticuerpo FB-28.4.2, de ahora en adelante hibridoma de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del hibridoma para la producción del anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención.

20 Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica antagonista del factor B del complemento útil para el tratamiento de enfermedades asociadas del complemento, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un preparado del anticuerpo anti-factor B de la invención que tiene el grado de pureza deseado, con portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes (Remington  
25 Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o acuosas.

30 Otro objeto de la invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención útil en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de patologías asociadas al complemento pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y degeneración macular asociada a la edad  
35 (AMD).

Otro objeto de la invención lo constituye un método de tratamiento de un desorden o una enfermedad asociada al complemento que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente activa del anticuerpo de la invención o de la composición farmacéutica de la invención y donde la enfermedad asociada a complemento se selecciona, a título ilustrativo y sin que limite la invención, de entre el siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y degeneración macular asociada a la edad (AMD).

5

Otro objeto de la presente invención lo constituye un complejo biotecnológico útil para la realización de ensayos biotecnológicos, en adelante complejo biotecnológico de la invención, que comprende el factor B y el anticuerpo anti-factor B de la invención.

15

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del complejo biotecnológico de la invención en la elaboración de ensayos biotecnológicos para la identificación y diseño de medicamentos o composiciones farmacéuticas inhibidores de la formación de la convertasa del C3 de la vía alternativa y de la activación del complemento para el tratamiento de enfermedades.

20

### **Descripción Detallada**

La presente invención se basa en que los inventores han observado que el hibridoma FB-28.4.2, produce un anticuerpo que reconoce específicamente y con gran afinidad (KD = 50 nM) un epítipo conformacional en el fragmento Ba del factor B y que cuando el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 se une a este epítipo en factor B, impide que el factor B se una a C3b y que se forme dicho complejo entre C3b y FB, y si el factor B está ya unido a C3b, favorece su disociación de la proconvertasa del C3 de la vía alternativa (C3bB). Como consecuencia de todo esto, el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 impide la generación de la proconvertasa del C3 de la vía alternativa y que el factor B sea cortado y activado por factor D para generar la convertasa del C3 (C3bBb) de la vía alternativa y la amplificación de la activación del complemento.

35

En este sentido, es correcto afirmar que el anticuerpo FB-28.4.2 es un potente inhibidor de la activación del complemento, y que un procedimiento que reproduzca el funcionamiento de este anticuerpo, representa una estrategia válida para generar inhibidores que bloqueen de

forma eficaz la generación de la convertasa del C3 de la vía alternativa del complemento y permitir así la elaboración de medicamentos para enfermedades que cursan con activación del complemento, incluso en situaciones causadas por mutantes ganancia de función de FB (D279G) como en el síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) (Figura 3).

5

Además, el anticuerpo FB-28.4.2 inhibió la activación del complemento *in vivo* en un modelo murino tras la inyección de un activador tan potente como el cobra venom factor (CVF) (Ejemplo 5).

10 En este sentido, es importante señalar el potencial valor que tiene el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2, en relación a anticuerpos generados contra péptidos o frente a anticuerpos policlonales anti-factor B en general, y por tanto, el hibridoma que lo produce representa una herramienta biotecnológica de gran valor técnico, el cual ha sido depositado en la colección de cultivos ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) el 13 de noviembre de 2012  
15 con la referencia 12111301.

Por otro lado, la presente invención describe el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 que reconoce específicamente el factor B humano y murino de forma cuantitativa, y que no presenta reactividades adicionales que podrían resultar en el reconocimiento de otras  
20 proteínas en el plasma de individuos de estas especies (Ejemplo 1).

Así, un primer objeto de la invención lo constituye un anticuerpo anti-factor B que bloquea la generación de la convertasa del C3 de la vía alternativa útil para prevenir o modular la activación o amplificación de la activación del complemento, en adelante anticuerpo anti-  
25 factor B de la invención, que es capaz de reconocer específicamente un epítipo en el fragmento Ba del factor B y cuya secuencia aminoacídica de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO1 y/o cuya secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica la  
30 SEQ ID NO4.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, sin limitación, anticuerpos únicos monoclonales anti- factor B (incluyendo agonistas, antagonistas, y anticuerpos neutralizantes) y composiciones de anticuerpos anti-factor B con  
35 especificidad poliepitópica (anticuerpos policlonales). El término "anticuerpo" comprende también a cualquier tipo de anticuerpo conocido tales como, pero sin limitarse a por ejemplo,

anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano.

5 En la presente memoria, el término "homología" significa que el aminoácido correspondiente o su secuencia de nucleótidos (por ejemplo, CDRs, dominio VH o VL) será idéntico o tendrá diferencias menores en las secuencias definidas específicamente. Las pequeñas diferencias de menor importancia incluyen cambios de aminoácidos, tales como 1 o 2 sustituciones en una secuencia de 5 aminoácidos de una región determinada. En el caso de los anticuerpos, el segundo anticuerpo tendría la misma especificidad (es decir, reconocería el mismo epítipo o su homólogo) y tendría, al menos, un 50% de la afinidad del primero.

15 Las secuencias sustancialmente idénticas u homólogas (por ejemplo, aquellas que comparten una identidad de, al menos, aproximadamente el 85% de la secuencia) a las secuencias descritas en este documento son también parte de esta solicitud. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o superior. En particular, cuando se trata de secuencias de CDRs, una homología sustancial se refiere preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología. Cuando se trata de secuencias más largas, tales como las secuencias de las regiones variables de cadena ligera o pesada, la homología puede ser al menos 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% , 97%, 98% o 99%. Aquellas secuencias que incluyen las regiones constantes pueden tener menos homología, por ejemplo, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o superior. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de la secuencia correspondiente del anticuerpo.

Un objeto preferente de la invención lo constituye el anticuerpo anti-factor B de la invención donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma.



Una realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención que está producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

5 Otra realización particular de la invención es el anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención que comprende las regiones de reconocimiento del antígeno variables y/o hipervariables de las cadenas ligeras y/o pesadas, o bien las propias cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo de la invención producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

10

Otra realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención que comprende en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada la SEQ ID NO1, o más concretamente que comprende en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada la SEQ ID NO4.

15

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante un procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención se pueden obtener mediante el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler et al. (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-7), o se pueden preparar por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, EE.UU. Pat. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al. ((1991) Nature 352: 624-628) y Marks et al. ((1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597).

35

Tal como se utiliza en la presente invención el término "anticuerpo específico", se refiere a un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantiene su capacidad de unión a antígeno, que se define como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs). En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camélidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camélidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

Los anticuerpos monoclonales incluyen también específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y / o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase de anticuerpo particular o subclase, mientras que el resto de las cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la deseada actividad biológica (Patente de EE.UU. N° 4.816.567; y Morrison et al (1984) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 81:6851-6855).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murina) son un tipo de anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la

especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para afinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos excepto al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al. ((1986) Nature 321: 522-525), Riechmann et al. ((1988) Nature 332: 323-329) y Presta ((1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596).

Otra realización particular de la invención lo constituye una variante del anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención que comprende en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada una secuencia mutada de la SEQ ID NO1, o más concretamente que comprende en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada una secuencia mutada de la SEQ ID NO4.

Tal y como se usa en la presente memoria, "anticuerpo mutante" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos en la que uno o más de los residuos de aminoácidos del anticuerpo se han modificado. Tales mutantes necesariamente tienen menos del 100% de identidad de secuencia o similitud con dicho anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo mutante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% identidad de secuencia aminoacídica o similitud con la secuencia de aminoácidos de, tanto el dominio de cadena pesada como el dominio variable de cadena ligera, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 95%. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácido del mismo grupo sobre la base de comunes de la cadena lateral de propiedades) con los residuos del anticuerpo, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguno de las alteraciones en la secuencia del anticuerpo

(extensiones internas, deleciones o inserciones en el extremo N-terminal o C-terminal) fuera del dominio variable se interpretará como que afecta la identidad de secuencia o similitud.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y / o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N-terminal o de secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

Tal y como se usa en este documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y pesadas de moléculas de anticuerpo que incluyen las secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (Complementarity Determining Regions o CDRs: es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y Regiones Marco (FRS). VH se refiere al dominio variable de la cadena pesada. VL se refiere a la región variable de la cadena ligera.

Tal como se utiliza aquí, el término "regiones determinantes de complementariedad (CDRs, es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable del anticuerpo de la presencia de los cuales son necesarios para la unión al antígeno (para nomenclatura ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Las "regiones marco" (Framework regions, en adelante FR) son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de CDR. Cada dominio variable tiene típicamente cuatro FRs identificado como FR1, FR2, FR3 y FR4 (para nomenclatura ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Otra realización particular de la invención lo constituye el anticuerpo anti-factor B de la invención constituido por un fragmento del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301. Una realización preferente lo constituye el anticuerpo anti-factor B de la invención  
 5 constituido por un fragmento Fab producido por digestión con papaína del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301 (Ejemplo 2).

El término "fragmento de anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio e incluye, sin  
 10 limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, (scFv)<sub>2</sub>, y la región determinante de la complementariedad (CDR) fragmentos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, minicuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

15 Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y el sitio de unión. Esta región consiste en un dímero de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. En esta configuración los tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero de  
 20 las regiones variables de las cadenas pesada y ligera (dímero VH-VL). Colectivamente, los seis CDRs o un subconjunto de los mismos confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque normalmente con una menor afinidad que el sitio de unión  
 25 completo.

El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> comprenden un par de fragmentos Fab que están generalmente  
 30 unidos covalentemente cerca de sus extremos carboxi por cisteínas bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos también son conocidos en la técnica.

El anticuerpo funcionalmente activo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej.  
 35 camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo funcionalmente activo” se refiere a un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantiene su capacidad de unión a antígeno, que se define como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs).

Los anticuerpos anti- Factor B de la invención se han obtenido usando como antígeno el factor B derivado de una especie de mamífero. Preferentemente, el antígeno es factor B humano. Sin embargo, el factor B de otras especies, tales como el factor B murino también se pueden utilizar como antígeno diana. Los antígenos de factor B de diversas especies de mamíferos se pueden aislar de fuentes naturales. En otras realizaciones, el antígeno se produce de forma recombinante o usando otros métodos sintéticos conocidos en la técnica.

A lo largo de la presente invención los términos “factor B” y “factor B del complemento” se usan de forma indistinta y se refieren a secuencias nativas y variantes de los polipéptidos del factor B. Otros nombres conocidos en el estado de la técnica para el factor B del complemento incluyen: componente de la C3/C5 convertasa de la vía alternativa del complemento, properdina factor B, betaglicoproteína rica en glicina y EC 3.4.21.47.

Otro objeto de la invención es el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301, que se caracteriza por producir el anticuerpo FB-28.4.2, de ahora en adelante hibridoma de la invención.

Un hibridoma es una línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor del anticuerpo específico de interés, con una línea celular de mieloma que no produce una inmunoglobulina propia. De esta forma se obtiene una línea celular inmortalizada capaz de producir el anticuerpo de interés.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del hibridoma para la producción del anticuerpo monoclonal anti-factor B de la invención.

Los anticuerpos anti-factor B de la presente invención pueden actuar como antagonistas del factor B impidiendo así la activación de la vía C3 del complemento; por ello pueden ser

administrados para el tratamiento de enfermedades asociadas del complemento en la forma de composiciones farmacéuticas.

5 El término "antagonista" se utiliza en el más amplio sentido, e incluye cualquier molécula que es capaz de neutralizar, bloquear, inhibir parcial o totalmente, reducir o interferir con una actividad biológica del factor B. Antagonistas del factor B incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-factor B y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, otros polipéptidos de unión, péptidos y no péptidos, moléculas de pequeño tamaño que se unen al factor B, y son capaces de neutralizar, bloquear, parcial o totalmente la inhibición, reducir o interferir con  
10 las actividades biológicas del factor B, tales como la capacidad para participar en una enfermedad asociada al complemento.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención en la elaboración de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de un  
15 desorden o una enfermedad asociada al complemento.

Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica antagonista del factor B del complemento útil para el tratamiento de enfermedades asociadas del complemento, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un  
20 preparado del anticuerpo anti-factor B de la invención que tiene el grado de pureza deseado, con portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes (Remington Pharmaceutical Sciences, 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o acuosas. Opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo. Las enfermedades asociadas al complemento pertenecen, a título ilustrativo y sin que  
25 limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), la enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), degeneración macular asociada a la edad (AMD) y hemólisis provocadas por venenos.

30 Los portadores, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina, conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; butil fenol, o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o  
35 propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol-); polipéptidos de

- bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo Zn-proteína), y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN (TM) , PLURONICS (TM) o el polietilenglicol (PEG).
- 5
- 10 También se pueden utilizar lipofectaminas o liposomas para que el polipéptido, anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, llegue a células diana. Cuando se utilicen fragmentos de anticuerpo, una realización preferida es el fragmento más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conservan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y / o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90, 7889-7893 [1993]).
- 15
- 20 Las moléculas activas también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington Pharmaceutical Ciencias 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).
- 25

La composición farmacéutica de la invención también se puede formular como una preparación de liberación sostenida del principio activo. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n. ° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y [gamma] etil-L-glutamato, no degradable de etilenoacetato de vinilo, degradables de ácido láctico-ácido glicólico, copolímeros de ácido tales

30

35



como el LUPRON DEPOT (TM) (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D (-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible diseñar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación intermolecular enlace S-S través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y/o desarrollando composiciones específicas de matriz de polímeros.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse de diversas formas que incluyen, pero no se limitan a, tópica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, administración intrapulmonar, intranasal, intralesional, ocular, intraocular o intravítrea. La administración parenteral incluye la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea.

Otro objeto de la invención es el uso de la composición farmacéutica de la invención útil en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de patologías asociadas al complemento pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), degeneración macular asociada a la edad (AMD) y hemólisis provocadas por venenos.

Opcionalmente, la composición farmacéutica de la invención podrá administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos.

La patología asociada a una enfermedad causada por alteraciones del complemento puede afectar entre otros a órganos como la visión, los riñones o el sistema vascular, e incluye, sin limitarse a estos, fenómenos que comprometen el bienestar del paciente como la

proliferación celular, la liberación de citocinas u otros productos de secreción en niveles anormales, la eliminación o aumento de una respuesta inmunológica o inflamatoria, la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos eosinófilos, monocitos, linfocitos) en los tejidos, la destrucción o degeneración tisular celular, el acumulo de restos celulares o depósitos en los tejidos, etc.

"Tratamiento" se refiere en la presente invención a una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Una "persona en necesidad de tratamiento" incluye aquellos casos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. En el tratamiento de una enfermedad de tipo inmunológico, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta de un componente de la respuesta inmune, o hacer la enfermedad más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, agentes anti-inflamatorios, agentes quimioterapéuticos, etc.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de un "antagonista del factor B", que se requiere para lograr una mejora apreciable en el estado, por ejemplo, una patología, de la enfermedad o condición objetivo del tratamiento.

Otro objeto de la invención lo constituye un método de tratamiento de un desorden o una enfermedad asociada al complemento que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente activa del anticuerpo de la invención o de la composición farmacéutica de la invención y donde la enfermedad asociada a complemento se selecciona, a título ilustrativo y sin que limite la invención, de entre el siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobulinuria paroxística nocturna (HPN) y degeneración macular asociada a la edad (AMD).

Una alternativa del método anterior comprende la administración de un segundo ingrediente activo con la composición farmacéutica de la invención.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un complejo biotecnológico útil para la realización de ensayos biotecnológicos, en adelante complejo biotecnológico de la invención, que comprende el factor B y el anticuerpo anti-factor B de la invención.

- 5 Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del anticuerpo anti-factor B de la invención para la elaboración del complejo biotecnológico de la invención.

El uso de este complejo biotecnológico de la invención permite generar elementos biológicos o información útil para la identificación y diseño de medicamentos o composiciones farmacéuticas inhibidoras de la formación de la convertasa del C3 de la vía alternativa y de la activación del complemento para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, el complejo biotecnológico de la invención puede utilizarse para generar datos cristalográficos que sirvan para el diseño de pequeñas moléculas inhibitorias y para desarrollar estrategias de cribado de librerías de compuestos en la búsqueda de otras moléculas que interaccionando con el sitio de unión del anticuerpo de la invención, por ejemplo el anticuerpo producido por el hibridoma FB-28.4.2, con el Factor B tengan el mismo o similar efecto inhibitorio.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del complejo biotecnológico de la invención en la elaboración de ensayos biotecnológicos para la identificación y diseño de medicamentos o composiciones farmacéuticas inhibidores de la formación de la convertasa del C3 de la vía alternativa y de la activación del complemento para el tratamiento de enfermedades.

## 25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.- Detalle del inmunógeno y del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2.** La figura muestra dos geles teñidos con Coomassie en los que se ilustra la pureza del factor B humano utilizado en la inmunización de los ratones y la composición de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 purificado a homogeneidad utilizando cromatografía de afinidad con una columna de proteína G.

**Figura 2.- El anticuerpo de la invención FB-28.4.2 reconoce el factor B humano y murino de forma específica y cuantitativa.** La parte A de la figura muestra un western blot con un policlonal anti FB y el anticuerpo de la invención FB-28.4.2. En el gel se corrieron (reducidas y sin reducir) una mezcla de proteínas purificadas conteniendo factor B humano y

sus fragmentos Bb y Ba; plasma humano completo; factor B purificado de plasma de ratón; y plasma completo de ratón. De este western blot se puede concluir que el anticuerpo de la invención FB-28.4.2 reconoce específicamente un epítipo en el fragmento Ba del factor B y que este epítipo, conservado en el FB humano y murino, es un epítipo conformacional que se pierde en condiciones de reducción. Además, se demuestra que el factor B es la única proteína en plasma humano o de ratón que es reconocida por el anticuerpo. En la parte B se muestra un gel teñido con Coomassie de las proteínas del plasma de ratón que se han retenido en una columna de afinidad construida con el anticuerpo FB-28.4.2. El hecho de que sólo se retenga factor B en este experimento demuestra la especificidad del anticuerpo de la invención FB-28.4.2 por factor B. En el panel C se muestra un ensayo de ELISA en el que se han inmovilizado factor B humano o sus fragmentos Bb y Ba purificados y en el que se ilustra que el anticuerpo de la invención FB-28.4.2 se une de modo específico y cuantitativo al factor B o a su fragmento Ba.

**Figura 3.- El anticuerpo de la invención (mAb) FB-28.4.2 impide la activación por FD en presencia de C3b del FB nativo o de una forma mutante de FB (D279G) asociada con síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS).** La figura muestra un gel teñido con Coomassie de un experimento en el que se preincubaron C3b y FB durante 10 minutos a 37°C antes de añadir el anticuerpo de la invención FB-28.4.2, otro anticuerpo monoclonal anti FB (FB-45, producción propia) o un anticuerpo monoclonal dirigido contra otra proteína (A7, [Vilchez D, Ros S, Daniel Cifuentes D, Pujadas L, Vallès J, Garcia-Fojeda B, Criado-García O, Fernández-Sánchez E, M<sup>a</sup> Iria Medraño MI, Domínguez J, García-Rocha M, Soriano E, Rodríguez de Córdoba S and Guinovart JJ. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. Nature Neurosciences 10:1407-1413, 2007]). Tras una incubación adicional de 10 minutos a 37°C en presencia o ausencia de estos anticuerpos, se añadió FD y se analizó la activación del FB. El gel ilustra que en presencia del anticuerpo de la invención FB-28.4.2 se inhibe de forma dosis dependiente la generación del fragmento Bb de ambos, el FB nativo y el FB mutante FBD279G. Todo esto demuestra que el anticuerpo de la invención FB-28.4.2 impide la formación de la proconvertasa del C3 de la AP C3bB y que favorece la disociación de la proconvertasa que pudiera haberse formado.

**Figura 4.- El fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 impide la activación por FD en presencia de C3b del FB nativo tanto en ausencia como en presencia de properdina.** La parte superior de la figura muestra un gel teñido con Coomassie de un experimento similar al mostrado en la Figura 3 en el que se muestra que distintas cantidades del

fragmento Fab del anticuerpo de la invención FB-28.4.2 impiden de modo dosis-dependiente la activación de FB en presencia o ausencia de properdina (P). La parte inferior muestra una figura con la cuantificación de esta inhibición medida como generación del fragmento activado Bb. Este experimento confirma que el anticuerpo FB-28.4.2 no solo bloquea la formación de la proconvertasa del C3 de la AP sino que además impide la activación del factor B en la proconvertasa formada y estabilizada por properdina (P).

**Figura 5.- Estudio del efecto inhibitorio del anticuerpo monoclonal de la invención FB-28.4.2 sobre la lisis de los eritrocitos de carnero producida por el suero humano en presencia del mAb anti fH OX24.** Los eritrocitos de carnero no se lisan en presencia de suero humano porque los protege el factor H. La adición del mAb anti fH OX24 que bloquea la actividad reguladora de la activación del complemento del FH produce la lisis de los eritrocitos. Esta lisis dependiente de factor H se inhibe de forma dosis dependiente por el anticuerpo FB-28.4.2. En el experimento que se muestra se han incubado 100  $\mu$ l de eritrocitos de carnero a una concentración de  $10^8$  cel/ml con 10  $\mu$ l de plasma humano (Concentración final de FB = 0.11 nM) en exceso de OX24. Se observa que añadiendo anticuerpo FB-28.4.2 se consigue una inhibición completa de la lisis a una concentración de anticuerpo de 0.066 nM.

**Figura 6.- Estudio del efecto inhibitorio del mAb FB-28.4.2 sobre la lisis de los eritrocitos de conejo producida por el suero humano.** Los eritrocitos de conejo se lisan en presencia de suero humano porque activan la AP del complemento de un modo que escapa la regulación por el FH. Esta lisis, dependiente del FB, se inhibe de forma dosis-dependiente por el anticuerpo de la invención FB-28.4.2. En el experimento que se muestra se han incubado 100  $\mu$ l de eritrocitos de conejo a una concentración de  $10^8$  cel/ml con 10  $\mu$ l de plasma humano (Concentración final de FB = 0.11nM). Se observa que añadiendo anticuerpo FB-28.4.2 se consigue una inhibición completa de la lisis a una concentración de anticuerpo de 0.133 nM.

**Figura 7.- Estudio del efecto inhibitorio del fragmento Fab del mAb FB-28.4.2 sobre la lisis de los eritrocitos de conejo producida por el suero humano.** Experimento similar al mostrado en la Figura 6 mostrando que el fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 es igualmente eficaz en su actividad inhibitoria de la activación del complemento que el anticuerpo completo.

35

**Figura 8.- Inhibición de la unión de FB a C3b por un fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2.** Experimento de Biacore utilizando un chip sobre el que se ha inmovilizado C3b a través de grupos aminos, en el que se muestra que el fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 bloquea la interacción del Factor B con C3b. Las concentraciones de Fab y Factor B en este experimento fueron 325 nM y 200 nM, respectivamente.

**Figura 9.- Unión del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 al FB unido a C3b.** En la parte superior del panel A de la figura se muestra el perfil de elución de la columna de Superosa-6 en la que se ha purificado el complejo AP C3 proconvertasa (C3bB)-Fab(FB-28.4.2). La caracterización de las proteínas en las distintas fracciones se realizó mediante tinción de plata con las proteínas individuales utilizadas como referencia, tal y como se muestra en el gel incluido en la parte A. En el panel B se muestran las medias 2D del estudio de microscopia electrónica de moléculas únicas mediante tinción negativa correspondiente a la AP C3 proconvertasa y al complejo AP C3 proconvertasa (C3bB)-Fab(FB-28.4.2). Los dominios estructurales de los componentes C3b, FB y Fab de estos complejos están indicados con flechas. Así, C345C (dominio C-terminal de los componentes del complemento C3, C4 y C5) y TED (dominio conteniendo el tioéster) son dominios estructurales de C3b y vWA (dominio von Willebrand tipo A), SP (dominio serín proteasa) y Ba son dominios estructurales del FB. El fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 se indica con una flecha blanca gruesa.

**Figura 10.- Inhibición de la activación del complemento *in vivo* por el anticuerpo monoclonal (mAb) FB-28.4.2.** En el experimento que se describe en la figura se analiza la activación del C3 por cobra venom factor (CVF) en el suero de ratones inyectados con 0,8 mg del anticuerpo FB-28.4.2 intravenoso, una hora, 24 y 48 horas después de la inyección. Como controles se utilizaron ratones inyectados solo con PBS. 10 microlitros de suero se incubaron en buffer AP50 con EDTA (25 mM) o con CVF (0.008 mg/ml) durante 15 min a 37°C. La reacción se paró con buffer de carga de SDS-PAGE y la activación del C3 medida como generación del fragmento C3dg se determinó mediante western blot utilizando un anticuerpo específico de este fragmento. En la figura se señala la posición del Fab FB-28.4.2 circulante en el plasma de ratón y se aprecia como disminuye con el paso del tiempo. La cadena pesada de la IgG de ratón que reacciona de forma cruzada con el anti-ratón utilizado como anticuerpo secundario esta también indicada.

**EJEMPLOS DE LA INVENCION**

Los siguientes ejemplos proporcionados en esta invención tienen carácter ilustrativo y no limitativo el alcance de la invención.

**5 Ejemplo 1.- Inmunización y generación del anticuerpo monoclonal frente a factor B de la invención**

1.1.- Obtención de la proteína factor B para usarla como inmunógeno en la producción de anticuerpos monoclonales.

10 La proteína factor B se obtuvo a partir de plasma humano mediante cromatografía de afinidad siguiendo procedimientos bien establecidos en la literatura. Antes de su utilización como inmunógeno, la proteína factor B se limpió de agregados mediante filtración en gel, comprobándose su pureza en geles de SDS-PAGE (Figura 1A).

15 1.2.- Inmunización y generación de anticuerpos monoclonales

Hembras de ratones C57Bl/6 deficientes de factor B se inmunizaron intraperitonealmente una vez cada dos semanas, hasta completar un total de tres veces, con 20 µg de la proteína factor B en adyuvante de SIGMA (MPL + TDM emulsión), según protocolos standard.

20 Después de la última inmunización, a los ratones que, según un ELISA anti factor B, poseían título de anticuerpos anti factor B, se les dio una dosis de empuje con 20 µg de una mezcla de fragmentos Ba y Bb en PBS. Tres días después se les extrajo el bazo, se purificaron los esplenocitos y se fusionaron con la línea X63AG8 de mieloma de ratón según protocolos previamente descritos (Antibodies, a laboratory manual. Eds. Ed Harlow and David Lane,

25 Cold Spring harbor Laboratory, 1988 pag 211-212). Los clones de hibridoma se seleccionaron y analizaron mediante ELISA para la producción de anticuerpos anti factor B. Los hibridomas que producían mAB que reconocían factor B se ensayaron ahora mediante "western blot" frente a factor B humano y murino y se seleccionaron aquellos que reconocían ambas proteínas. Los hibridomas seleccionados se clonaron mediante dilución límite y se

30 expandieron. Uno de estos anticuerpos, denominado FB-28.4.2 se purificó utilizando cromatografía de afinidad con proteína G (HiTrap protein G, GE Healthcare). Hay que resaltar que la cadena pesada del anticuerpo FB-28.4.2 se presenta como un doblete por motivos que se desconocen (Figura 1B). El isotipo IgG2bkappa del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 se determinó usando el IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche

35 Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El hibridoma productor del anticuerpo FB-28.4.2 se ha depositado en la colección de cultivos ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo FB-28.4.2 de la invención se describe como SEQ ID NO1 y la secuencia de aminoácidos de su región variable como SEQ ID NO4. Esta secuencia se obtuvo a partir fragmentos de PCR obtenidos de un cDNA generado del RNA total del hibridoma FB-28.4.2 utilizando cebadores específicos (sense: GTCCCTGAACACACTGACTC (SEQ ID NO2); antisentido: CAAGGGATGCATGGATATG  
10 (SEQ ID NO3)).

1.3.- Confirmación de la especificidad del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 de la invención.

La especificidad del anticuerpo FB-28.4.2 de la invención se determinó mediante ensayos de  
15 western blot utilizando plasma y proteínas purificadas humanas y murinas. Los resultados de estos experimentos demostraron que el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 reconoce específicamente un epítipo conformacional en el fragmento Ba de la molécula del FB humano y murino (Figura 2). La afinidad del anticuerpo de la invención FB-28.4.2 por el factor B, medida como Kd, se estimó en 50 nM utilizando SPR (Biacore).

20

1.3.1. El anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 reconoce específicamente un epítipo en el fragmento Ba del factor B humano y murino.

Mediante experimentos de ELISA y western blot utilizando factor B humano y sus  
25 fragmentos Bb y Ba purificados se demostró que el anticuerpo monoclonal de la invención FB-28.4.2 reconoce de modo específico y cuantitativo un epítipo localizado en el fragmento Ba del factor B (Figuras 2A), conservado en el FB humano y murino, es un epítipo conformacional que se pierde en condiciones de reducción. Además, se demuestra que el factor B es la única proteína en plasma humano o de ratón que es reconocida por el  
30 anticuerpo.

1.3.2. El anticuerpo monoclonal de la invención FB-28.4.2 retiene específicamente el FB del plasma de ratón en experimentos de cromatografía de afinidad.

35 El anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 se unió covalentemente a una matriz de sefarosa mediante procedimientos convencionales y se utilizó para purificar factor B de plasma de



ratón mediante un solo paso de cromatografía de afinidad. El factor B murino resultante se caracterizó mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Figura 2B).

Resultados similares se obtuvieron en un ensayo de ELISA (Figura 2C) en el que se observa  
5 que el anticuerpo monoclonal de la invención FB-28.4.2 se une de modo específico y cuantitativo al factor B o a su fragmento Ba.

**Ejemplo 2.- Un fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 impide la unión del FB a C3b, bloqueando su activación por FD de manera dosis-dependiente en presencia o  
10 ausencia de properdina.**

En primer lugar, se obtuvo el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en la colección de cultivos ECACC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301, producido por digestión con papaína utilizando el  
15 preparado comercial "Fab preparation kit" de Thermo Scientific (ref. 44885).

Las proteínas humanas C3b, factor B y properdina purificadas en el laboratorio siguiendo procedimientos habituales se utilizaron, junto con factor D obtenido de una casa comercial, en ensayos *in vitro* para demostrar que este fragmento Fab del anticuerpo monoclonal FB-  
20 28.4.2, cuando se une a factor B, bloquea su activación por factor D en presencia de C3b y que esta actividad inhibitoria es independiente de la presencia de properdina (Figura 4).

En estudios complementarios se ha demostrado también que esta inhibición de la activación del factor B por el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 ocurre también cuando el factor B es  
25 una forma mutante de FB (D279G) asociada con síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) (Figura 3).

Igualmente, se demuestra mediante experimentos de Biacore que el Fab del anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 bloquea la unión del factor B a C3b (Figura 8).

30 Es importante señalar que en algunos de los experimentos el factor B se incubó previamente con C3b antes de añadir el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2, y que a pesar de ello este fue capaz de bloquear completamente la activación del factor B por factor D. Esto sugiere que el anticuerpo monoclonal de la invención es capaz de unirse al factor B en la AP C3 proconvertasa e inducir la disociación del complejo C3bB (Figuras 4 y 5). Consistente con  
35 esta interpretación de que el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2 también interacciona con FB

unido a C3b, es el hecho que se ha sido capaz de visualizar mediante microscopía electrónica el complejo C3bB-Fab(FB-28.4.2) (Figura 9).

**Ejemplo 3.- El anticuerpo monoclonal de la invención FB-28.4.2 inhibe la lisis de eritrocitos mediada por complemento en ensayos hemolíticos dependientes de FH y FB.**

Para demostrar que el anticuerpo de la invención FB-28.4.2 bloquea la activación del complemento, se han realizado ensayos hemolíticos utilizando dos sistemas complementarios. En un primer grupo de experimentos, se han utilizado eritrocitos de carnero y sueros EGTA. En estas condiciones, los eritrocitos de carnero no se lisan porque el factor H presente en el suero lo impide. Utilizando el anticuerpo OX24 que bloquea factor H se consigue la lisis de los eritrocitos generando un sistema equivalente a las situaciones de desregulación del complemento patológicas que se producen como consecuencia de defectos en factor H. En este sistema se demuestra que la adición de cantidades crecientes del anticuerpo FB-28.4.2 bloquea progresivamente la lisis de los eritrocitos hasta inhibir por completo la activación del complemento. Se demuestra además que este efecto es específico para el anticuerpo monoclonal FB-28.4.2, ya que otros anticuerpos no lo producen (control mAb) (Figura 5).

En el segundo grupo de experimentos se ha utilizado eritrocitos de conejo y sueros sin aditivos. Los eritrocitos de conejo activan la vía alternativa del complemento de un modo dependiente de FB y se lisan espontáneamente en presencia de suero humano. Como en el caso de los eritrocitos de carnero, la adición de cantidades crecientes del anticuerpo FB-28.4.2 bloquea progresivamente la lisis de los eritrocitos de conejo hasta inhibir por completo la activación de la vía alternativa del complemento. Esta actividad inhibitoria es de nuevo específica del anticuerpo FB-28.4.2 (Figura 6). En experimentos similares se ha demostrado que la inhibición de la lisis de los eritrocitos de conejo se consigue igualmente con el fragmento Fab del anticuerpo FB-28.4.2 (Figura 7).

**Ejemplo 4.- El anticuerpo FB-28.4.2 inhibe la activación del complemento *in vivo* en un modelo murino.**

Se han inyectado en ratones C57BL/6 0,8 mg del anticuerpo FB-28.4.2 y se ha confirmado después la inyección, la completa inhibición del complemento por un activador tan potente como el cobra venom factor (CVF) (Figura 10).

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Anticuerpo anti-factor B que bloquea la generación de la convertasa del C3 de la vía alternativa útil para prevenir o modular la activación o amplificación de la activación del complemento caracterizado por que es capaz de reconocer específicamente un epítipo en el fragmento Ba del factor B y cuya secuencia aminoacídica de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica SEQ ID NO1 y/o cuya secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada presenta un porcentaje de homología de al menos el 95% respecto a la secuencia aminoacídica la SEQ ID NO4.
- 2.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que es un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma.
- 3.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que está producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.
- 4.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que comprende las regiones de reconocimiento del antígeno variables y/o hipervariables de las cadenas ligeras y/o pesadas, o bien de las propias cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 3.
- 5.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que comprende en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada la SEQ ID NO1.
- 6.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que comprende en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada la SEQ ID NO4.
- 7.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 1 caracterizado por que está constituido por un fragmento del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.
- 8.- Anticuerpo anti-factor B según la reivindicación 7 caracterizado por que el fragmento es un fragmento Fab producido por digestión con papaína.

9.- Hibridoma FB-28.4.2 depositado en ACECC el 13 de noviembre de 2012 con la referencia 12111301.

5 10.- El uso del hibridoma según la reivindicación 9 para la producción del anticuerpo monoclonal anti-factor B según la reivindicación 3.

11.- Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8 en la elaboración de un medicamento o una composición farmacéutica para el tratamiento de un desorden o una enfermedad asociada al complemento.

10

12.- Composición farmacéutica antagonista del factor B del complemento útil para el tratamiento de una enfermedad asociada del complemento caracterizada por que comprende el anticuerpo anti-factor B según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8 con portadores farmacéuticamente aceptables.

15

13.- Composición farmacéutica según la reivindicación 12 caracterizada por que la enfermedad asociada al complemento pertenece al siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y degeneración macular asociada a la edad (AMD).

20

14.- Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 12 y 13 útil en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de una enfermedad asociada al complemento.

25

15.- Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 14 caracterizado por que la enfermedad asociada al complemento perteneciente al siguiente grupo: artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), glomerulonefritis, esclerosis múltiple (EM), isquemia / repercusión, glomerulopatías por depósito aislado de C3 (C3G), síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS), enfermedad hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) y degeneración macular asociada a la edad (AMD).

30

16.- Uso de la composición según las reivindicaciones 14 y 15 caracterizado por que la composición farmacéutica puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos.

35

**17.-** Complejo biotecnológico útil para la realización de ensayos biotecnológicos caracterizado por que comprende el factor B y el anticuerpo anti-factor B según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8.

5 **18.-** Uso del anticuerpo anti-factor B según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8 para la elaboración del complejo biotecnológico según la reivindicación 17.

10 **19.-** Uso del complejo biotecnológico de la reivindicación 17 en la elaboración de ensayos biotecnológicos para la identificación y diseño de medicamentos o composiciones farmacéuticas inhibidoras de la formación de la convertasa del C3 de la vía alternativa y de la activación del complemento.

Figura 1

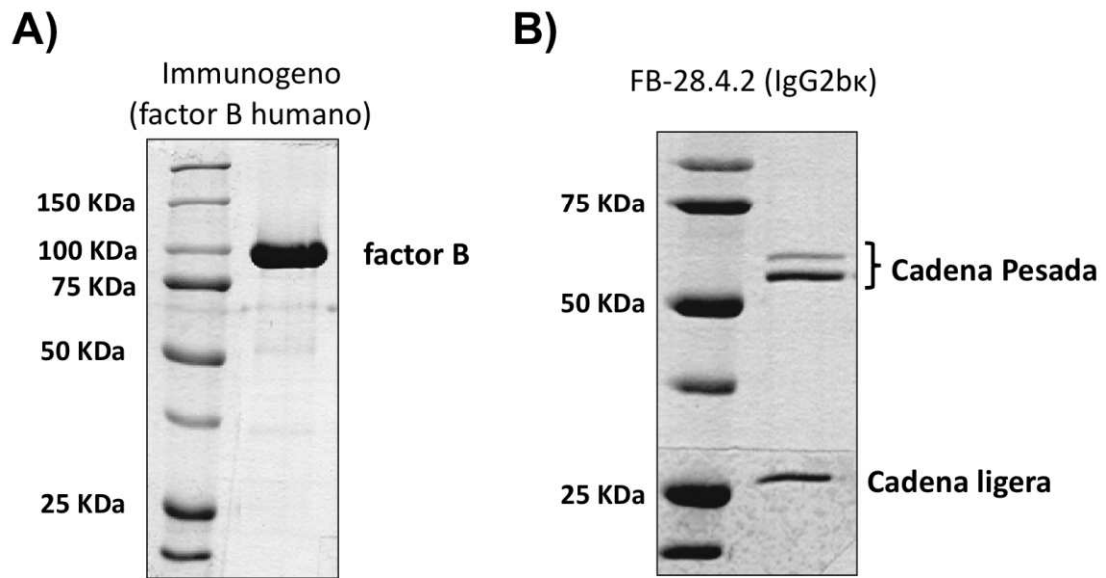
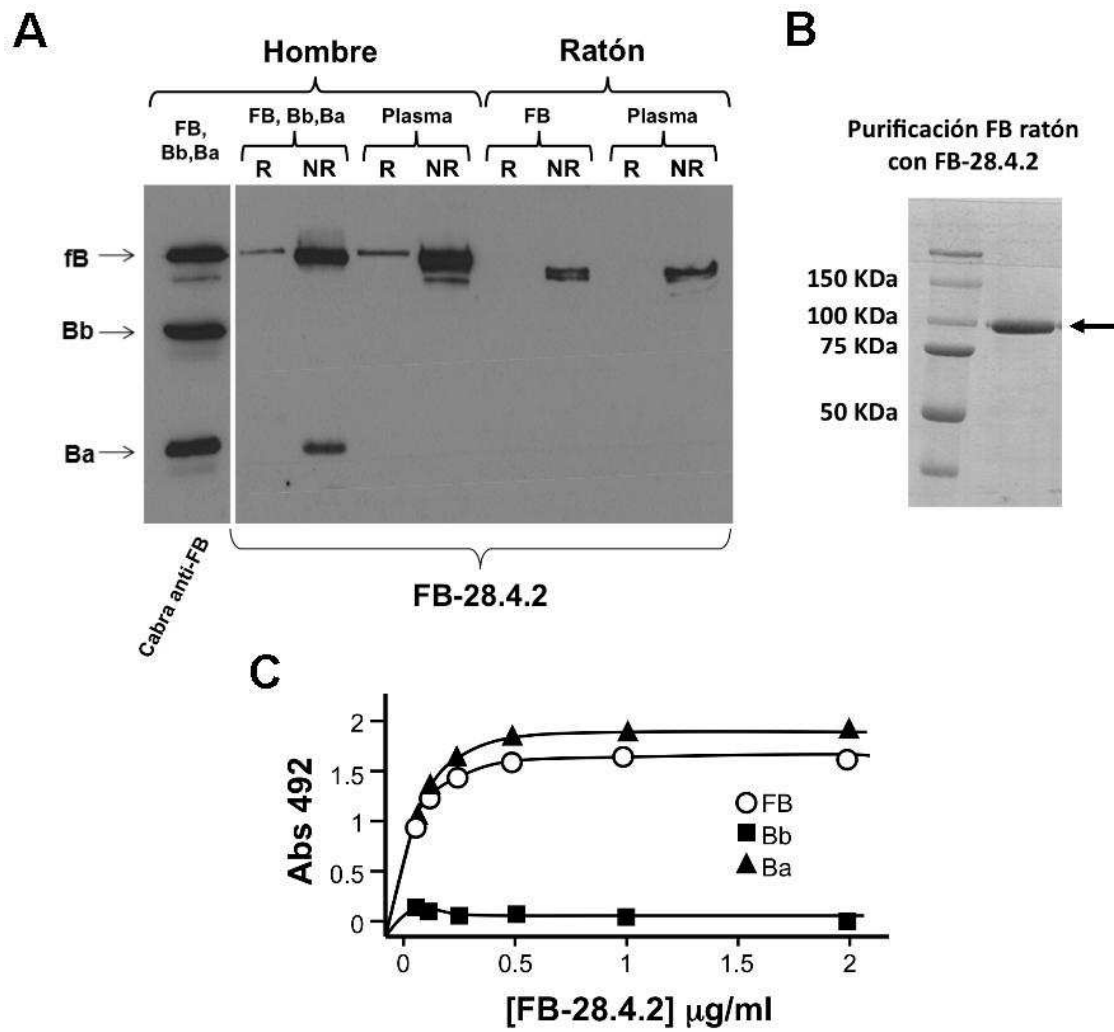
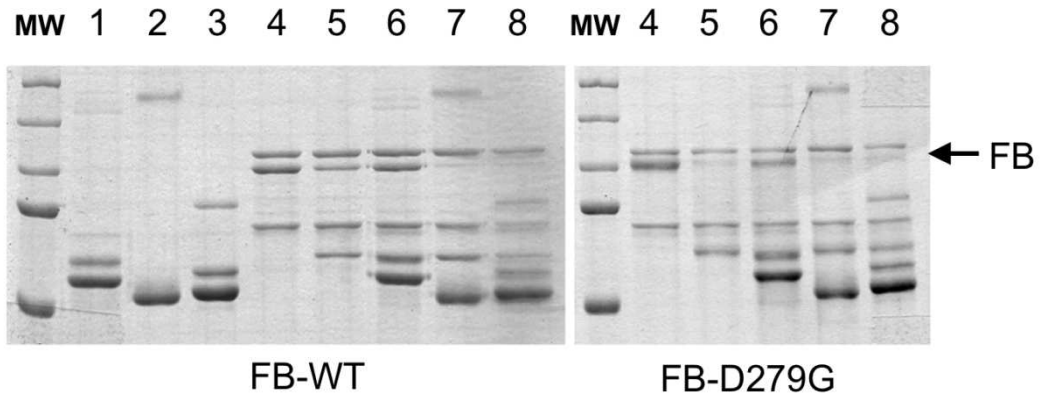


Figura 2



**Figura 3**



- |               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| 1- mAb 28.4.2 | 5- C3b + FB + FD              |
| 2- mAb 45     | 6- C3b + FB + FD + mAb 28.4.2 |
| 3- mAb A7     | 7- C3b + FB + FD + mAb 45     |
| 4- C3b + FB   | 8- C3b + FB + FD + mAb A7     |



Figura 4

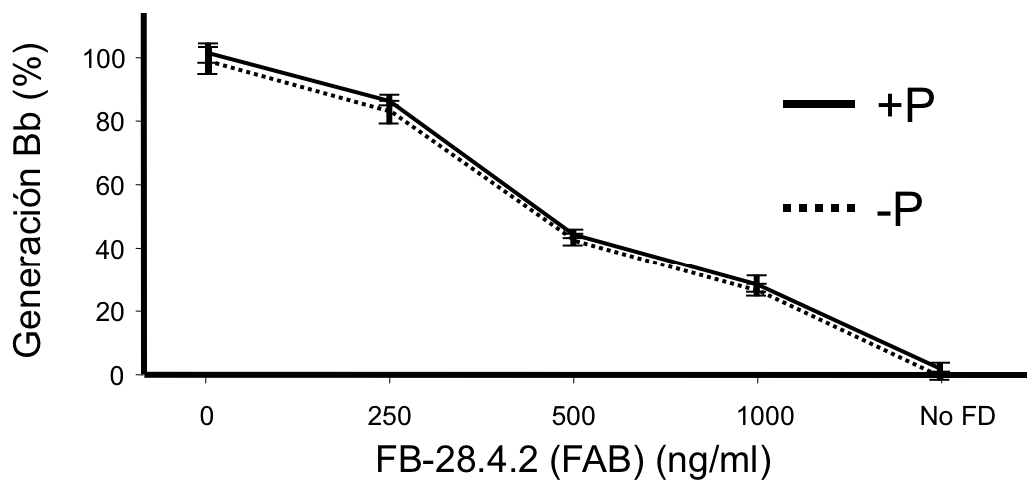
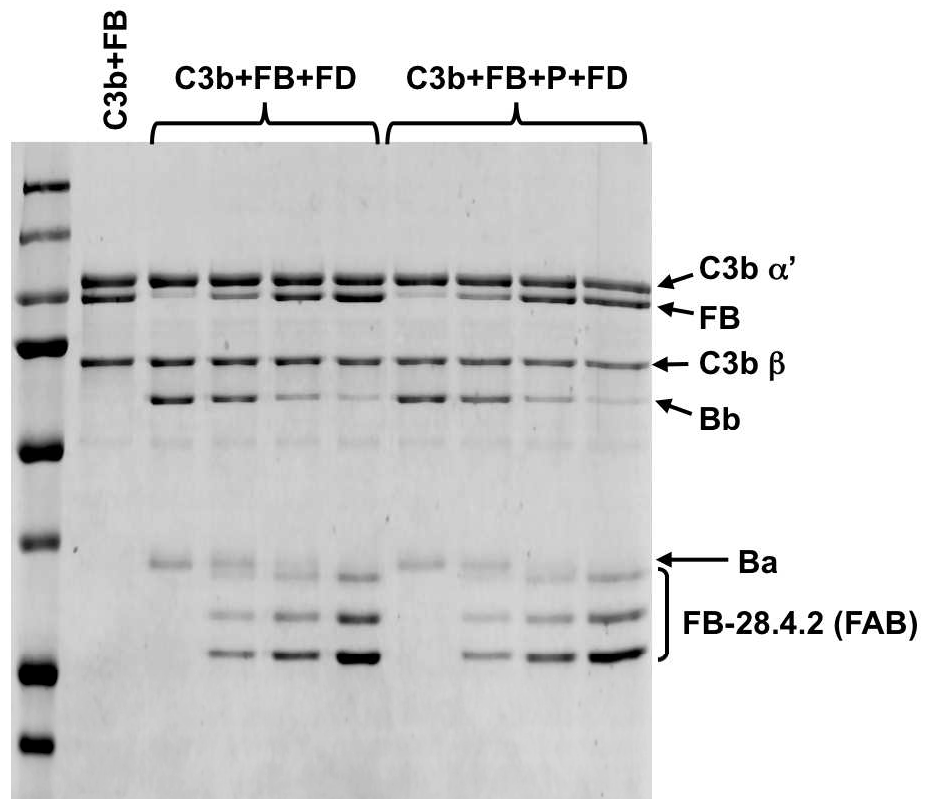


Figura 5

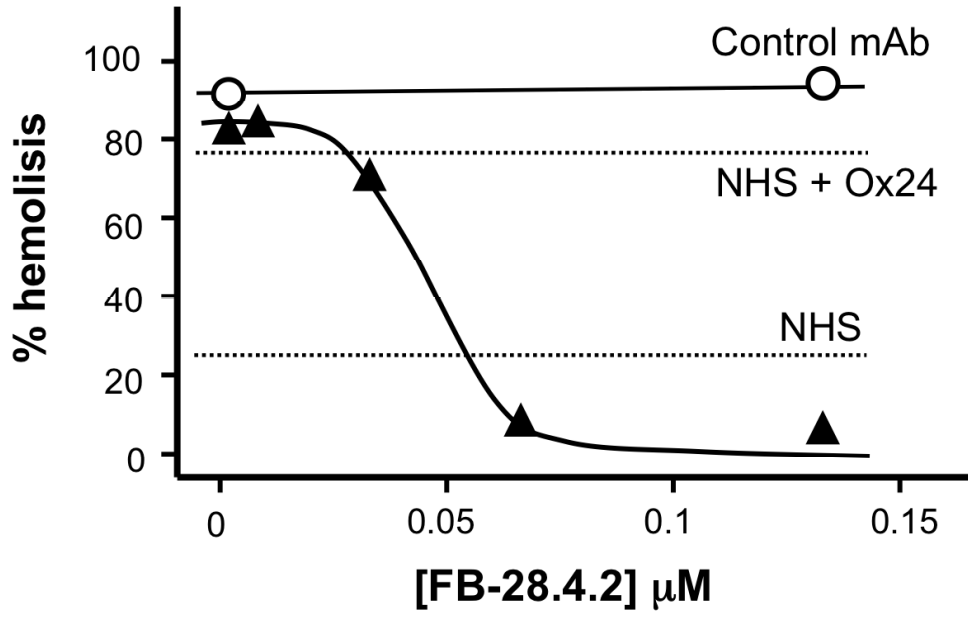


Figura 6

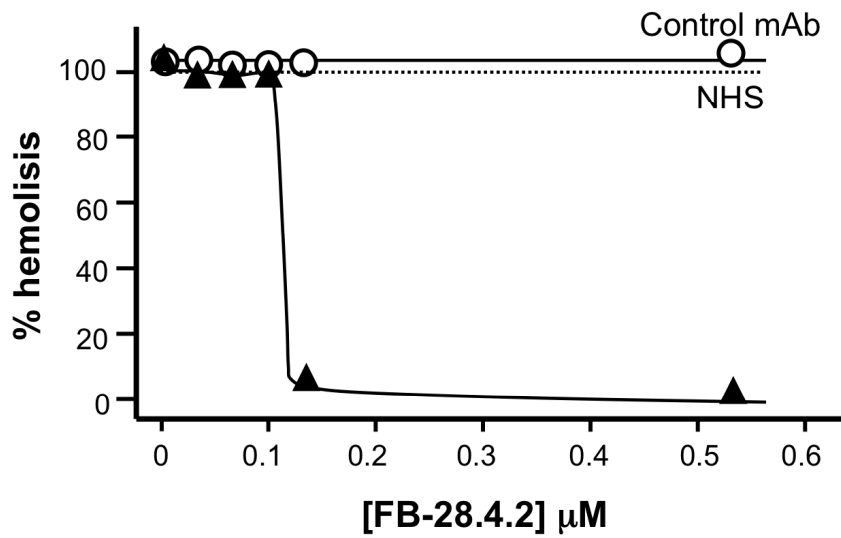


Figura 7

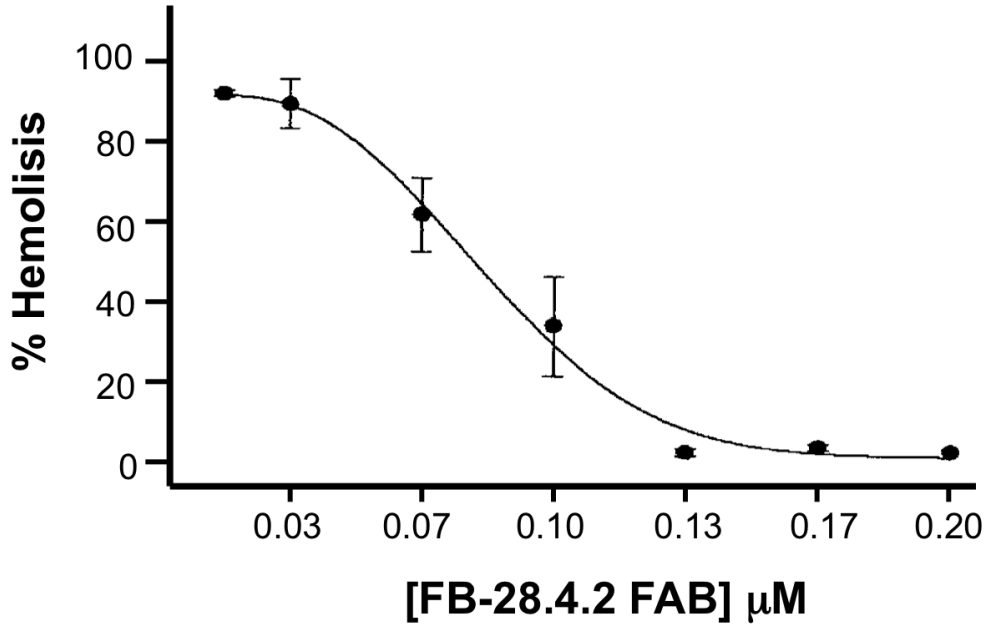


Figura 8

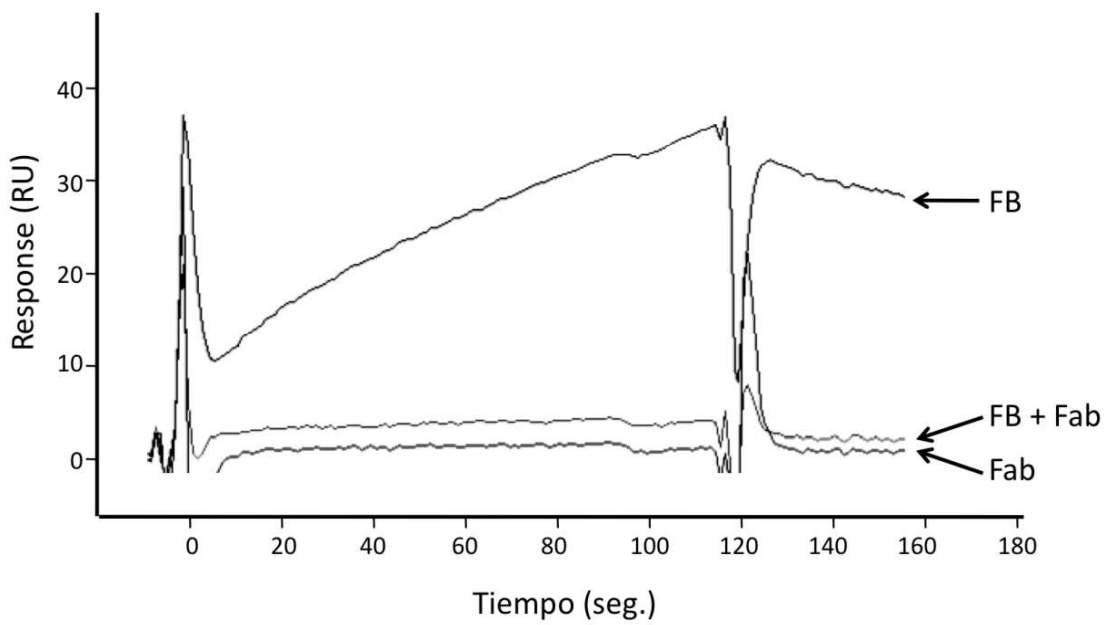


Figura 9

A

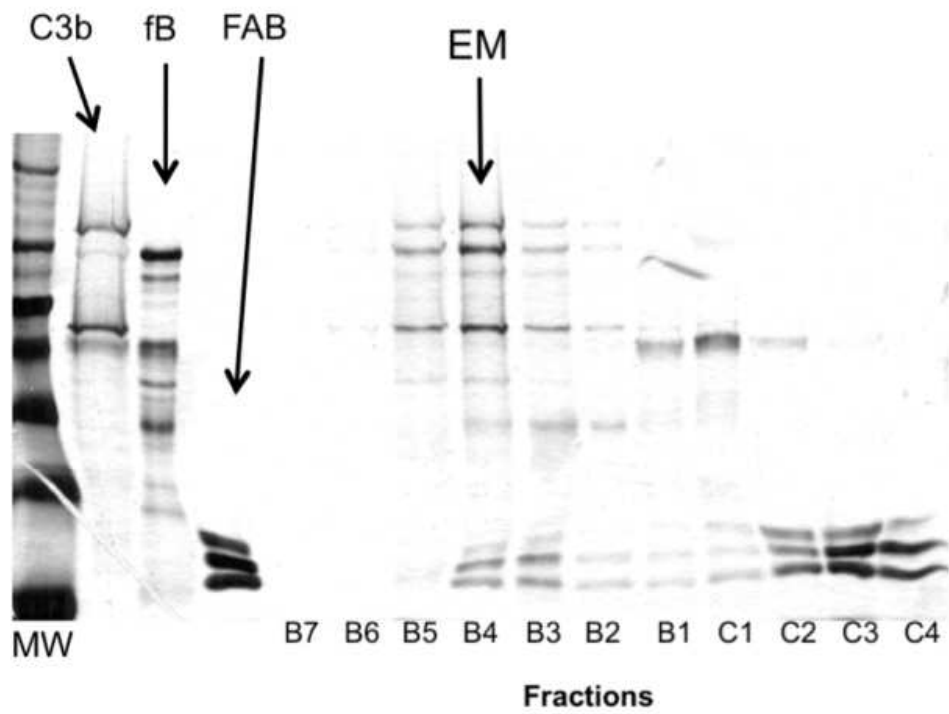
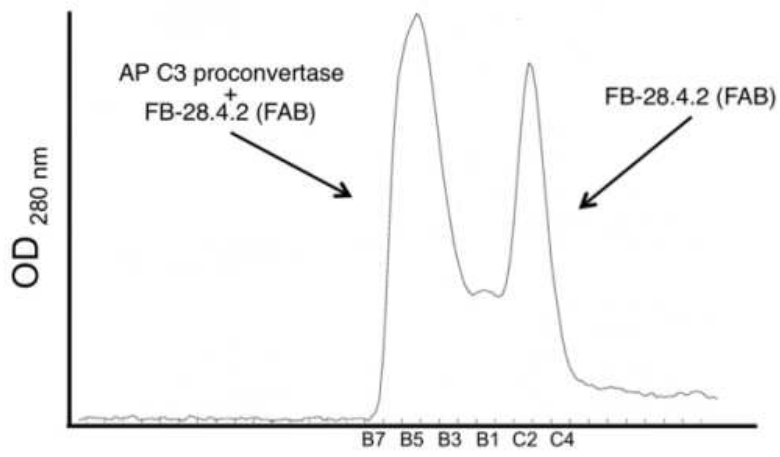


Figura 9 (cont.)

B

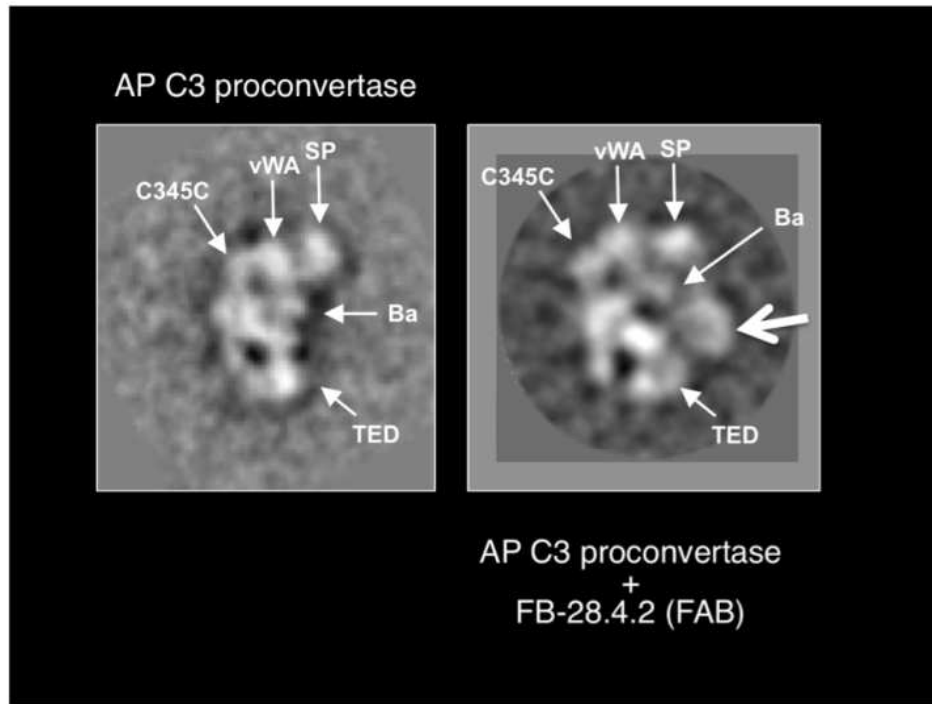
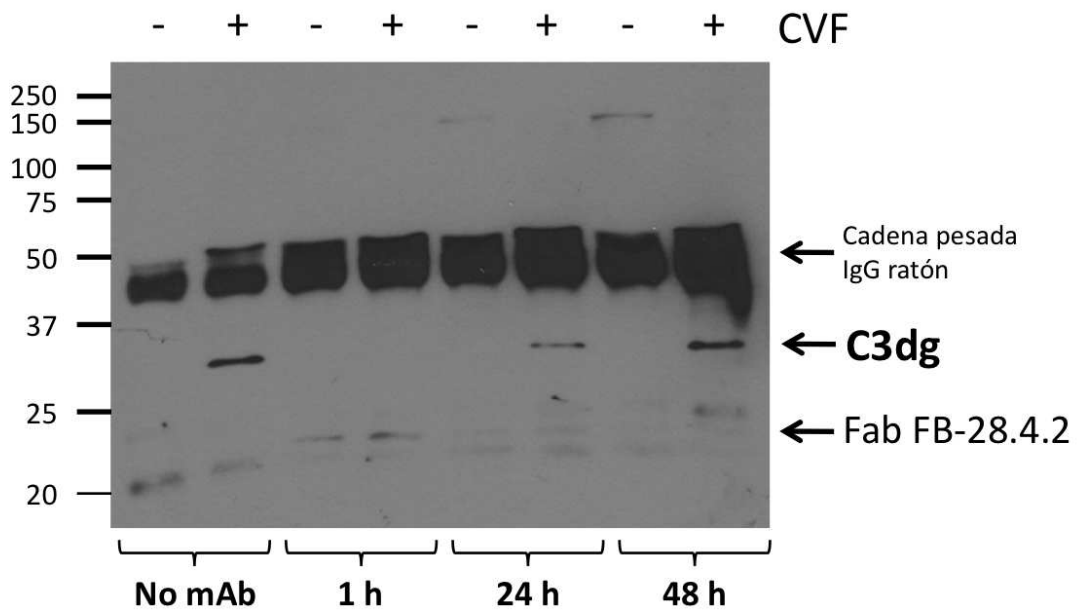


Figura 10



# ES 2 514 165 A1

## Listado de Secuencias

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Salud Carlos III

<120> ANTICUERPO ANTI-FACTOR B, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA ÚTIL PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL COMPLEMENTO Y SUS APLICACIONES

<130> 2013-0154

<160> 4

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Leu | Leu | Phe | Leu | Ser | Gly | Thr | Ala | Gly | Val | Leu | Ser | Glu | Val | Gln |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Asp | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ile | Pro | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asp | Tyr | Asn | Met | Asp |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Trp | Val | Lys | Gln | Ser | His | Gly | Lys | Ser | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Asp | Ile |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Asn | Pro | His | Asn | Gly | Gly | Ile | Phe | Tyr | Asn | Gln | Asn | Phe | Lys | Gly | Lys |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Arg | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gly | Arg | Arg |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Asn | Tyr | Thr | Tyr | Trp | Phe | Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Thr | Gly | Thr | Thr | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Ser | Val | Tyr | Pro | Leu | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Pro | Gly | Cys | Gly | Asp | Thr | Thr | Gly | Ser | Ser | Val | Thr | Leu | Gly | Cys | Leu |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Val | Lys | Gly | Tyr | Phe | Pro | Glu | Ser | Val | Thr | Val | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Leu | Ser | Ser | Ser | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Leu | Leu | Gln | Ser | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Leu | Tyr | Thr | Met | Ser | Ser | Ser | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Thr | Trp | Pro |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Ser | Gln | Thr | Val | Thr | Cys | Ser | Val | Ala | His | Pro | Ala | Ser | Ser | Thr | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Val | Asp | Lys | Lys | Leu | Glu | Pro | Ser | Gly | Pro | Ile | Ser | Thr | Ile | Asn | Pro |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Lys | Glu | Cys | His | Lys | Cys | Pro | Ala | Pro | Asn | Leu | Glu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Asn | Ile | Lys | Asp | Val | Leu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Met | Ile | Ser | Leu | Thr | Pro | Lys | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Glu | Asp | Asp | Pro | Asp | Val | Arg | Ile | Ser | Trp | Phe | Val | Asn | Asn | Val | Glu |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | His | Thr | Ala | Gln | Thr | Gln | Thr | His | Arg | Glu | Asp | Tyr | Asn | Ser | Thr |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ile | Arg | Val | Val | Ser | Ala | Leu | Pro | Ile | Gln | His | Gln | Asp | Trp | Met | Ser |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gly | Lys | Glu | Phe | Lys | Cys | Lys | Val | Asn | Lys | Asp | Leu | Pro | Ser | Pro |     |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Ile | Glu | Arg | Thr | Ile | Ser | Lys | Ile | Lys | Gly | Leu | Val | Arg | Ala | Pro | Gln |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Val | Tyr | Ile | Leu | Pro | Pro | Pro | Ala | Glu | Gln | Leu | Ser | Arg | Lys | Asp | Val |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Val | Gly | Phe | Asn | Pro | Gly | Asp | Ile | Ser | Val |

ES 2 514 165 A1

```

385          390          395          400
Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala
          405          410
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asp
          420          425          430
Ile Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val
          435          440          445
Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg
          450          455          460
Ser Pro Gly Lys
465

```

```

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /note="Cebador secuenciación"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<400> 2
gtccctgaac acactgactc

```

20

```

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="unassigned DNA"
      /note="Cebador antisense secuenciación"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<400> 3
caagggatgc atggatatg

```

19

```

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 4
Phe Leu Leu Phe Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val Leu Ser Glu Val Gln
1          5          10          15
Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
20          25          30
Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp
35          40          45
Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile
50          55          60
Asn Pro His Asn Gly Gly Ile Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Gly Lys
65          70          75          80
Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
85          90          95
Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Arg
100         105         110
Asn Tyr Thr Tyr Trp Phe Phe Asp
115         120

```