

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 675**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2005 E 05838191 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 1802325**

54 Título: **Polipéptido CRlg para la prevención y el tratamiento de trastornos asociados al complemento**

30 Prioridad:

12.10.2004 US 964263

22.06.2005 US 159919

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

27.04.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

ASHKENAZI, AVI;

HELMY, KARIM YUSSEF;

FONG, SHERMAN;

GODDARD, AUDREY;

GURNEY, AUSTIN L.;

KATSCHKE, JR., KENNETH JAMES;

LOOKEREN, MENNO VAN y

WOOD, WILLIAM I.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 675 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

Polipéptido CRlg para la prevención y el tratamiento de trastornos asociados al complemento.

5 **Campo de la invención**

La presente invención concierne a un receptor específico de macrófagos recientemente descubierto, CRlg (anteriormente denominado STlgMA), y a su uso en la prevención y/o el tratamiento de afecciones oculares asociadas al complemento, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) y la neovascularización coroidal (NVC).

Antecedentes de la invención

El sistema del complemento es una cascada compleja de enzimas constituido por una serie de glucoproteínas séricas que normalmente existen en forma de proenzima inactiva. Tres rutas principales, la ruta clásica y la ruta alternativa, que convergen al nivel de C3, pueden activar el complemento, donde dos convertasas de C3 similares escinden C3 en C3a y C3b. También se ha descrito una ruta adicional, la ruta de la lectina de unión a manosa (LUM).

Los componentes de la ruta clásica se identifican con una C y un número (por ejemplo, C1, C3). Debido a la secuencia en la que estos se identificaron, los cuatro primeros componentes están numerados C1, C4, C2 y C3. Los componentes de la ruta alternativa se indican con letras (por ejemplo B, P, D). Los fragmentos de escisión se designan con una letra minúscula después de la designación del componente (por ejemplo, C3a y C3b son fragmentos de C3). El fragmento C3b inactivo se designa como iC3b. Las cadenas polipeptídicas de las proteínas del complemento se designan con una letra griega después del componente (por ejemplo, C3 α y C3 β , las cadenas α y β de C3). Las abreviaturas de los receptores de la membrana celular de C3 son CR1, CR2, CR3 y CR4.

La ruta clásica del sistema del complemento es un efector principal de la rama humoral de la respuesta inmunitaria humana. El desencadenante activador de la ruta clásica y de la ruta LUM (lectina de unión a manosa) es el anticuerpo de IgG o de IgM unido a antígenos o a lectinas en las células diana. La unión del anticuerpo al antígeno expone un sitio del anticuerpo que es un sitio de unión para el primer componente del complemento, C1. C1 se une a las regiones expuestas de al menos dos anticuerpos unidos a antígeno, y como resultado, se activan sus subunidades C1r y C1s. La subunidad C1s activada es responsable de la escisión de los dos siguientes componentes del complemento implicados, C4 y C2. C4 se escinde en dos fragmentos, de los cuales la molécula más grande de C4b, se une a la membrana diana cercana, mientras que la molécula pequeña de C4a se retira. Un sitio expuesto en C4b depositado está disponible para interaccionar con el siguiente componente del complemento, C2. Inmediatamente como en la etapa anterior, C1s activado escinde la molécula de C2 en dos partes, de las cuales permanece el fragmento C2a, mientras el fragmento más pequeño C2b, se retira. C4b2a, también conocida como convertasa C3, permanece unida a la membrana. Esta convertasa C3 convierte el siguiente componente del complemento, C3 en su forma activa.

La activación de la ruta alternativa del complemento comienza cuando C3b se une a la pared celular y a otros componentes celulares de los patógenos y/o a anticuerpos de IgG. Después, el factor B se combina con C3b unido a la célula y forma C3bB. C3bB se separa después en Bb y Ba mediante el factor B, para la formación de la convertasa de C3 de la ruta alternativa, C3bBb. La properdina, una proteína sérica, se une después a C3bBb y forma C3bBbP que actúa como una convertasa de C3, que separa enzimáticamente moléculas de C3 en C3a y C3b. En este punto, se activa la ruta alternativa del complemento. Parte de C3b se une a C3bBb para formar C3bBb3b, que es capaz de separar moléculas de C5 en C5a y C5b.

La ruta alternativa es una ruta de autoamplificación y es importante en la eliminación y el reconocimiento de bacterias y otros patógenos en ausencia de anticuerpos. La ruta alternativa también puede amplificar la activación del complemento después de la activación inicial del complemento mediante cualquiera de la ruta de la lectina y/o clásica. La etapa limitante de la velocidad de activación de la ruta alternativa en seres humanos es la acción enzimática del factor D en la escisión del factor B para formar la convertasa de C3 de la ruta alternativa, C3bBb. (Stahl *et al.*, American Journal of Pathology 162: 449-455 (2003)). Existen pruebas contundentes sobre el papel de la activación y deposición del complemento en la artritis inducida por adyuvante (AIA), y en la artritis inducida por colágeno (AIC) y en diversas otras enfermedades y afecciones.

Recientemente, el control defectuoso de la ruta alternativa se ha implicado en el desarrollo de enfermedades renales y oculares, incluyendo el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la DMRE (Zipfel *et al.*, Mol. Immunol. 43: 97-106 (2006), disponible en línea en www.sciencedirect.com). Se ha descubierto que C3 es esencial para el desarrollo de NVC en ratones (Bora *et al.*, J. Immunol. 174(1): 491-7 (2005)).

También es muy conocido el papel del sistema del complemento en afecciones inflamatorias y daño asociado a tejidos, enfermedades inmunitarias y enfermedades asociadas al complemento.

Se ha sugerido que la ruta alternativa juega un papel importante en la inflamación (Mollnes *et al.*, Trends in Immunology 23: 61-64 (2002)), en el daño tisular local y remoto después de isquemia y reperfusión (Stahl *et al.*, anteriormente mencionado); síndrome de diestrés respiratorio del adulto (SDRA, Schein *et al.*; Chest 91: 850-854 (1987)); activación del complemento durante la cirugía de derivación cardiopulmonar (Fung *et al.*, J Thorac Cardiovasc Surg 122: 113-122 (2001)); dermatomiositis (Kissel, JT *et al.*, NEJM 314: 329-334 (1986)); y pénfigo (Honguchi *et al.*, J Invest Dermatol 92: 588-592 (1989)). La ruta alternativa del complemento también se ha implicado en enfermedades autoinmunitarias, tales como, por ejemplo, nefritis lúpica y glomerulonefritis y vasculitis resultante (véase, por ejemplo, Watanabe *et al.*, J. Immunol. 164: 786-794 (2000)); y artritis reumatoide, tal como artritis reumatoide juvenil (Aggarwal *et al.*, Rheumatology 29: 189-192 (2000); y Neumann E. *et al.*, Arthritis Rheum. 4: 934-45 (2002)).

El aumento local de la deposición y activación del complemento se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Atkinson, J Clin Invest 112: 1639-1641 (2003)). Se han sometido a ensayo antagonistas del receptor de C5a, tales como péptidos y moléculas orgánicas pequeñas, para el tratamiento de la artritis (Woodruff *et al.*, Arthritis & Rheumatism 46(9): 2476-2485 (2002)), y diversas otras enfermedades inmunoinflamatorias (Short *et al.*, Br J Pharmacol 126: 551-554 (1999); Finch *et al.*, J Med Chem 42: 1965-1074 (1999)); y compañías, tales como Promics (Australia), han llevado a cabo ensayos clínicos en seres humanos para ensayar la eficacia de antagonistas de C5a en indicaciones similares. C5a también está implicado en dermatomiositis y pénfigo (Kissel, JT *et al.*, NEJM 314:329-334 (1986)). Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales anti-C5a que reducen la disfunción endotelial coronaria inducida por derivación cardiopulmonar y cardioplegia (Tofukuji *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 116: 1060-1069 (1998)), previenen la artritis inducida por colágeno y mejoran la enfermedad establecida (Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. A 92(19): 8955-8959 (1995)).

La opsonofagocitosis, el proceso de deposición de fragmentos del complemento en la superficie de partículas y la captación posterior por células fagocíticas, es crucial para la eliminación de partículas circulantes que incluyen complejos inmunitarios, células apoptóticas o desechos celulares y patógenos (Gasque, P., Mol Immunol. 41: 1089-1098 (2004)). Se sabe que los macrófagos residentes en los tejidos juegan un papel importante en la eliminación de partículas, mediada por complemento, de la circulación. Las células de Kupffer, que constituyen más del 90 % de los macrófagos residentes en los tejidos, están continuamente expuestas a la sangre de la vena porta hepática y están estratégicamente situadas en los sinusoides hepáticos para eliminar eficazmente del tracto gastrointestinal, virus, células tumorales, bacterias, hongos, parásitos y sustancias nocivas opsonizadas. Este proceso de eliminación depende en gran parte de la presencia del complemento C3 como una opsonina (Fujita *et al.*, Immunol. Rev. 198: 185-202 (2004)). Después de la unión a las superficies bacterianas por medio de un tioéster, C3 se escinde y amplifica la ruta alternativa del complemento. Esta reacción conduce a la deposición adicional de fragmentos C3 que pueden servir como ligandos para receptores del complemento en macrófagos. La importancia de esta ruta se muestra por la alta susceptibilidad de los seres humanos que carecen de C3 a infecciones bacterianas y víricas.

Los receptores del complemento caracterizados hasta ahora, CR1, 3 y 4 internalizan C3b y fagocitan partículas opsonizadas de C3 solo después de la activación de PKC o de la estimulación del receptor de Fc (Carpentier *et al.*, Cell Regul 2, 41-55 (1991); Sengelov, Crit. Rev. Immunol.15: 107-131 (1995); Sengelov *et al.*, J. Immunol.153: 804-810 (1994). Además, CR1 no se expresa en la superficie de células de Kupffer murinas (Fang *et al.*, J. Immunol. 160: 5273-5279 (1998). Hasta ahora, no se han descrito receptores del complemento que ayuden a las CK en la eliminación constitutiva de partículas circulantes.

Se ha notificado que el anticuerpo anti-C3b(i) potencia la activación del complemento, la deposición de C3b(i), y la destrucción de células CD20+ por rituximab (Kennedy *et al.*, Blood 101(3): 1071-1079 (2003)).

En vista de la implicación conocida de la cascada del complemento en una diversidad de enfermedades, existe una necesidad para la identificación y el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas al complemento.

El documento WO 94/16719 A divulga un método para tratar enfermedades asociadas con inflamación o con activación inapropiada del complemento, que comprende la administración de una proteína CR1 soluble (receptor del complemento de tipo 1) y un éster de amidinofenilo o amidinonaftilo.

El documento WO 2004/028635 divulga un método para suministrar a la retina una proteína, tal como el factor del complemento CD59, para el tratamiento de trastornos de la retina, que incluyen desprendimiento de retina, retinopatía diabética, neovascularización retiniana, neovascularización coroidal y edema retiniano incluyendo edema macular.

El documento WO 00/53758 A2 divulga un método para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunitario, tal como un trastorno mediado por linfocitos T, administrando un polipéptido, tal como un polipéptido PRO362, un anticuerpo agonista del mismo, un anticuerpo antagonista del mismo o un fragmento del mismo. Los polipéptidos pueden fusionarse con una inmunoglobulina, incluyendo las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1.

El documento WO 2004/022594 desvela ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que modulan respuestas inmunitarias, incluyendo un péptido de SEC ID N° 42, y su uso en métodos para tratar enfermedades autoinmunitarias o enfermedades que se benefician de una respuesta inmunitaria potenciada o reducida.

5 El documento WO 01/36432 divulga proteínas humanas secretadas, incluyendo una proteína de SEC ID N° 63, y el uso de los péptidos, o agonistas o antagonistas de la misma, para el tratamiento de enfermedades del sistema inmunitario.

Rollins y Sims, J. Immunol 144(9): 3478-3483 (1990) divulgan la actividad inhibidora del complemento de CD59.

10 Johnson *et al.* Experimental Eye Research 73(6): 887-896 (2001) divulgan la activación del complemento y los procesos inflamatorios en la formación de drusas y degeneración macular relacionada con la edad.

15 Zhang *et al.*, Diabetes 51(12): 3499-3504 (2002) divulgan la activación precoz del complemento y la disminución de niveles de inhibidores del complemento anclados a glucosilfosfatidilinositol en retinopatía diabética experimental y en seres humanos.

Walker, Biochimica et, Biophysica Acta 1574: 387-390(2002) desvelan que la Ig Z39 se expresa conjuntamente con genes de macrófagos activados.

20 Sumario de la invención

La presente invención se basa en la identificación de un nuevo miembro de la familia de receptores del complemento y del primer miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) que interacciona con el sistema del complemento.

25 En un aspecto, la invención concierne a un polipéptido CRlg, o a una inmunoadhesina CRlg, que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección ocular asociada al complemento, en la que el polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg es un inhibidor selectivo de la ruta alternativa del complemento.

30 La afección ocular asociada al complemento puede ser, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), neovascularización coroidal (NVC), uveítis, retinopatía diabética y otra relacionada con isquemia, endoftalmitis, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, Oclusión de la Vena Central de la Retina (OVCN), neovascularización corneal y neovascularización retiniana. Preferentemente, la afección ocular asociada al complemento es DMRE o NVC, incluyendo todas las fases de estas afecciones.

35 En todas las realizaciones, el polipéptido CRlg puede seleccionarse, por ejemplo, entre los polipéptidos CRlg de las SEC ID Nos: 2, 4, 6 y 8, y los dominios extracelulares (DEC) de dichos polipéptidos. El polipéptido CRlg, incluyendo los polipéptidos de longitud completa y sus DEC, pueden fusionarse a una secuencia de inmunoglobulina, tal como una secuencia de región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, por ejemplo, la región Fc, y las inmunoadhesinas resultantes, pueden usarse como un agonista de CRlg, en métodos preventivos y de tratamiento. Preferentemente, la inmunoglobulina es una IgG, tal como IgG-1 o IgG-2, o IgG-3, o IgG-4, más preferentemente, IgG-1 o IgG-3. La secuencia de región constante de la cadena pesada de la IgG1 puede comprender, por ejemplo, al menos la región bisagra CH1, CH2 y CH3, o la región bisagra CH2 y CH3.

40 En un aspecto adicional, la invención concierne a un polipéptido CRlg, o a una inmunoadhesina CRlg que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en la prevención del desarrollo o progresión de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) en un sujeto con riesgo de desarrollar una DMRE o que presenta un diagnóstico de DMRE en al menos un ojo.

45 En otro aspecto, la invención concierne a un polipéptido CRlg, o a una inmunoadhesina CRlg que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) seca.

50 En todas las realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero, tal como un paciente humano.

Breve descripción de las figuras

60 Las Figuras 1A-1B muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de un polipéptido CRlg humano de 321 aminoácidos (SEC ID Nos: 1 y 2, respectivamente).

Las Figuras 2A-2B muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la forma larga de longitud completa de 399 aminoácidos del CRlg humano nativo (huCRlg o huCRlg-largo; SEC ID Nos: 3 y 4, respectivamente).

65 Las Figuras 3A-3B muestran las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la forma corta de 305 aminoácidos del CRlg humano nativo (huCRlg-corto, SEC ID Nos: 5 y 6, respectivamente).

Las Figuras 4A-4C muestran las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del CRlg murino nativo (muCRlg, SEC ID Nos: 7 y 8, respectivamente) de 280 aminoácidos.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos del huCRlg de longitud completa (SEC ID N°: 4) y del huCRlg-corto (SEC ID N°: 6) en alineamiento con muCRlg (SEC ID N°: 8). Se muestran la secuencia señal hidrófoba, IgV, la IgC y las regiones transmembrana. muCRlg tiene un único sitio de glucosilación ligada a N predicho en la posición 170 (NGTG). Se indican los límites del dominio de Ig, deducidos de los límites exón-intrón del gen de CRlg humano.

La Figura 6 muestra la hibridación *in situ* de CRlg en secciones congeladas de hígado de ratón.

La Figura 7 muestra la hibridación *in situ* de CRlg en secciones congeladas de hígado humano.

La Figura 8 muestra la hibridación *in situ* de CRlg en macrófagos activados de colon y adrenales, en células de Kupffer y en células de Hofbauer placentarias.

La Figura 9 muestra la hibridación *in situ* del ARNm de CRlg en células sinoviales de AR.

La Figura 10 muestra la hibridación *in situ* del ARNm de CRlg en células de la microglia cerebral.

La Figura 11 muestra la hibridación *in situ* del ARNm de CRlg en células de tejido asmático de seres humanos.

La Figura 12 muestra la hibridación *in situ* del ARNm de CRlg en células de tejido de hepatitis crónica en seres humanos.

La Figura 13 muestra el análisis inmunohistoquímico de CRlg en macrófagos de la glándula adrenal.

La Figura 14 muestra el análisis inmunohistoquímico de CRlg en células de Kupffer hepáticas.

La Figura 15 muestra el análisis inmunohistoquímico de CRlg en células de la microglia cerebral.

La Figura 16 muestra el análisis inmunohistoquímico de CRlg en células de Hofbauer placentarias.

La Figura 17 muestra un análisis de transferencia de Northern que muestra la expresión de huCRlg en una variedad de tejidos. Dos transcritos de 1,5 y 1,8 kb estaban presentes en los tejidos humanos que expresaban CRlg.

Figura 18. (A) Análisis de PCR TAQMAN™ que muestra el aumento de la expresión de huCRlg en líneas celulares mielomonocíticas HL60 y THP-1 y en macrófagos diferenciados. Se encontraron bajos niveles de expresión en las líneas de linfocitos T Jurkat, MOLT3, MOLT4 y en linfocitos B RAMOS. (B) Aumento de la expresión del ARNm de huCRlg durante la diferenciación *in vitro* de monocitos. Monocitos aislados de sangre periférica humana se diferenciaron adhiriéndolos a plástico durante un periodo de 7 días. El ARN total se extrajo en diferentes momentos durante la diferenciación. (C) Aumento de la expresión de la proteína huCRlg durante la diferenciación de monocitos en macrófagos. Los monocitos se trataron tal como se indica en (B), los lisados celulares completos se procesaron en un gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con un anticuerpo policlonal (4F7) contra huCRlg. El anticuerpo policlonal reconoció una banda de 48 kDa y otra de 38 kDa que posiblemente representaban la forma larga y corta de huCRlg.

Figura 19. Caracterización molecular de la proteína huCRlg en líneas celulares. (A) La proteína huCRlg-gd se expresó transitoriamente en células HEK293, se inmunoprecipitó con anti-gd y las transferencias se incubaron con anti-gd o con un anticuerpo policlonal contra el dominio extracelular de CRlg. (B) La proteína huCRlg expresada en células HEK293 es una proteína monomérica N-glucosilada. La tirosina de CRlg está fosforilada después del tratamiento de las células HEK293 con pervanadato sódico pero no atrae a la Syk quinasa. La proteína CRlg fosforilada migra a un peso molecular ligeramente mayor en comparación con la CRlg no fosforilada.

Figura 20. Expresión selectiva de huCRlg en macrófagos derivados de monocitos humanos. Las células mononucleares de sangre periférica se tiñeron con anticuerpos específicos para linfocitos citotóxicos naturales, B, T, monocitos y con un anticuerpo monoclonal (3C9) conjugado con ALEXA™ A488 contra CRlg. La expresión estuvo ausente en todos los leucocitos de sangre periférica así como en células dendríticas derivadas de monocitos, pero se expresó en macrófagos diferenciados *in vitro*.

Figura 21. La expresión de la proteína y del ARNm de CRlg se aumentó con IL-10 y dexametasona. (A) La PCR en tiempo real muestra el aumento de la expresión del ARNm de CRlg después del tratamiento con IL-10, TGFβ y se indujo altamente con dexametasona pero se reguló negativamente por tratamiento con LPS, IFNγ, y TNFα. (B) Las células mononucleares de sangre periférica separadas por Ficoll se trataron con diversas citocinas y dexametasona durante 5 días y se tiñeron doblemente con anti-CD14 y anti-CRlg. El análisis de flujo mostró un aumento drástico en la expresión de CRlg en la superficie de monocitos tratados con dexametasona y después del tratamiento con IL-10 y LPS.

Figura 22. Localización subcelular de CRlg en macrófagos derivados de monocitos. Los monocitos se cultivaron durante 7 días en medio de diferenciación de macrófagos, se fijaron en acetona y se tiñeron con anticuerpo policlonal anti-CRlg 6F1 o CD63 y anti-conejo de cabra secundario conjugado con FITC. Las células se estudiaron en un microscopio confocal. Se encontró CRlg en el citoplasma donde se localiza conjuntamente con la proteína de membrana lisosomal CD63. CRlg también se expresó en los bordes posterior y delantero de los macrófagos con un patrón similar al de la F-actina. Barra de escala =10 μm.

Figura 23. Localización de ARNm de CRlg en enfermedades inflamatorias crónicas. La hibridación *in situ* mostró la presencia de ARNm de CRlg en macrófagos alveolares obtenidos de tejido de un paciente con neumonía (A, B) o de un paciente con asma crónica (C, D). El ARNm de CRlg también se expresó en células de Kupffer hepáticas en tejido obtenido de una biopsia de hígado de un paciente con hepatitis crónica (E, F).

Figura 24. La expresión de ARNm de CRlg estaba aumentada en sinovio inflamado. El ARNm de CRlg fue bajo o estaba ausente en las membranas sinoviales de una articulación obtenida de una sustitución de rodilla de un paciente que no tenía inflamación articular (A, C) pero que se expresaba altamente en células, posiblemente sinoviocitos o macrófagos sinoviales, en el *pannus* de un paciente con osteoartritis (B, D).

Figura 25. Detección de la proteína CRlg con el anticuerpo policlonal 6F1 en células que revisten el sinovio de un paciente con enfermedad articular degenerativa (A, B, C). No se encontró detección inmunohistoquímica de CRlg en un sinovio control (D).

Figura 26. La proteína CRlg se expresó en un subtipo de macrófagos residentes en tejido y su expresión aumentó en enfermedades inflamatorias crónicas. (A) CRlg se expresó en la membrana de células CHO que expresaban de manera estable CRlg. Se encontró alta expresión de la proteína CRlg en macrófagos alveolares (B) en tejidos obtenidos de un paciente con asma crónica. (C) Expresión de CRlg en histiocitos del intestino delgado humano. La sección se obtuvo de tejido extirpado quirúrgicamente y podría contener un neoplasma. (D) Expresión de la proteína CRlg en células de Hofbauer en placenta humana de pretérmino. La alta expresión de la proteína CRlg en macrófagos estaba presente en la glándula adrenal (E) y en las células de Kupffer de hígado humano (F). Se realizó tinción en secciones de 5 μ m de espesor fijadas en acetona usando DAB como cromógeno. Las imágenes se fotografiaron a 20X y 40X aumentos.

Figura 27. Tinción inmunohistoquímica de CD68 y CRlg en una placa vascular obtenida de un paciente con aterosclerosis. Secciones consecutivas se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra CD68 humano (A, B) y un anticuerpo policlonal 6F1 suscitado contra la proteína CRlg humana (C, D). CRlg apareció en una población de macrófagos y en células espumosas presentes en la placa aterosclerótica, y se solapó con los macrófagos CD68 positivos, tal y como se evalúa en la tinción de secciones consecutivas. Aumentos: 10X (A, C) y 20X (B, D).

Figura 28. Cotinción de CRlg y CD68 en macrófagos intersticiales de corazón. Se obtuvieron secciones de 5 μ m de un corazón humano (autopsia) y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra CRlg (3C9) y con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC. CD68 se detectó por tinción con un anticuerpo monoclonal contra CD68 marcado con PE. Aumentos: 20X.

Figura 29. Los niveles de ARNm de CRlg están significativamente elevados en tejido de colon obtenido de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar oclusiva crónica (EPOC) y asma. La PCR en tiempo real se realizó en el ARN total extraído de los diversos tejidos. El ARNm para CRlg estaba significativamente aumentado en tejidos obtenidos de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y EPOC. El análisis estadístico se realizó usando el ensayo de la U de Mann-Whitney.

Figura 30. Las células que expresan la proteína CRlg humana mostraron una adherencia aumentada para las células endoteliales humanas. (A) CRlg se expresó de modo estable en una línea celular de linfocitos T Jurkat. (B) Las células se precargaron con el colorante fluorescente BCECF (Molecular Probes, Oregón) y se añadieron a una placa de 96 pocillos recubierta con una monocapa de células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC) tratadas con o sin TNF α 10 ng/ml. Después de 3 lavados, se contó la fluorescencia en un espectrofluorómetro que indicaba el número de células que permanecían adheridas a las células HUVEC. La gráfica fue representativa de 4 experimentos independientes.

Figura 31. Inhibición de la progresión del modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (AIC) mediante la proteína de fusión muCRlg IgG-Fc. Un grupo de ratones (AIC) (n=7) recibió 100 μ g de proteína de fusión muCRlg IgG-Fc (cuadrados), mientras que un grupo de ratones control AIC (n=8) recibió 100 μ g de IgG1 murina (círculos), 3 veces por semana durante 6 semanas. Se examinó a los ratones diariamente con respecto a los signos de inflamación y se recibieron una puntuación en una escala de 0-16 (detalles en el Ejemplo 25) y los resultados se representaron gráficamente (media $\pm$ DT, valor p del ensayo de la T de Student=0,0004 para la IgG1 control frente a la proteína muCRlg de ensayo).

La Figura 32 es la secuencia de nucleótidos del ADN42257 (secuencia consenso) (SEC ID N°: 9).

La Figura 33 muestra la reducción de la hinchazón articular en ratones tratados con CRlg-Fc.

La Figura 34 muestra que muCRlg inhibe la inflamación articular.

La Figura 35 muestra la preservación del volumen del hueso cortical en articulaciones de ratones tratados con muCRlg-Fc.

La Figura 36 muestra que el tratamiento con CRlg-Fc no altera el número ni la morfología de los macrófagos residentes en los tejidos.

La Figura 37 muestra que el tratamiento con muCRlg no afecta a los títulos de los anticuerpos anti-colágeno en suero.

La Figura 38 muestra que la proteína muCRlg no altera las respuestas de células B independientes de células T *in vivo*.

La Figura 39 muestra la infiltración de macrófagos en las articulaciones después de artritis inducida por anticuerpos (AIA), generada con la tinción F4/80 en articulaciones no descalcificadas congeladas.

La Figura 40 muestra que muCRlg-Fc previene la hinchazón articular después de artritis inducida por anticuerpos en ratones Balb/c.

La Figura 41 muestra que muCRlg inhibe la inflamación articular en artritis inducida por anticuerpos.

La Figura 42 muestra la generación de ratones muCRlg genosuprimidos (*knock-out*).

La Figura 43 muestra que la proteína de fusión CRlg-Fc se une a glóbulos rojos de oveja opsonizados con C3 (E-IgM).

La Figura 44 muestra que la unión de CRlg-Fc humano a E-IgM es dependiente de C3.

La Figura 45 muestra la unión de partículas opsonizadas con suero con células CHO que expresan CRlg.

La Figura 46 muestra que la CRlg-Fc murina que se une a C3b y a C3bi del complemento pero no se une a C2, C4, C3c y C3d.

La Figura 47 muestra que la CRlg-Fc murina y humana se une a C3b, C3bi y C3c del complemento pero no se une a C1, C2, C4, C3a y C3d.

La Figura 48A muestra que la CRlg-Fc murina y humana inhiben la deposición de C3 sobre zimosano.

La Figura 48B muestra que la CRlg-Fc murina inhibe la activación de C3 en suero.

5 La Figura 49 muestra que la CRlg murina inhibe la hemólisis inducida por la ruta alternativa pero no afecta a la hemólisis de la ruta clásica.

Figura 50, CRlg se expresa selectivamente en una subpoblación de macrófagos residentes en tejidos.

10 (A) CRlg es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas con un solo dominio transmembrana que consiste en uno (CRlg humano corto (huCRlg(C)) y CRlg murino (muCRlg) o dos dominios de inmunoglobulina (huCRlg(L)). La escala de la parte superior del panel izquierdo indica el tamaño en aminoácidos. El panel de la derecha muestra que el huCRlg y el muCRlg están distantemente relacionados con la molécula A de adhesión funcional (JAM-A) y el antígeno A33. La escala de la parte superior del panel derecho indica el % de aminoácidos similares.

15 (B) CRlg se expresa en macrófagos pero no en monocitos. Se analizaron monocitos CD14+ humanos y monocitos CD14+ cultivados durante 7 días en suero autólogo al 10 % y en suero bovino fetal al 20 % para la tinción de huCRlg por citometría de flujo usando un AcM anti-CRlg humano (3C9). Las células de Kupffer hepáticas CD11b+ y F4/80+ de ratón se analizaron para la tinción de muCRlg usando un AcM anti-muCRlg (14G6).

20 (C) Análisis de transferencia de Western de macrófagos humanos y de ratón. Los lisados de los monocitos CD14+ humanos cultivados durante los periodos de tiempo indicados o los macrófagos peritoneales de ratón se hirvieron en tampón reductor SDS, se cargaron en un gel de Tris-glicina al 4-10 % y se incubaron con un anticuerpo anti-CRlg policlonal (6F1, panel izquierdo) o con un anticuerpo anti-muCRlg monoclonal (14C6, panel derecho). La IgG preinmune (panel izquierdo) y la IgG2b de rata (panel derecho) se usaron como
25 controles de isotipo. Las flechas del panel izquierdo indican la posición de una banda de 57 y de 50 kDa que posiblemente representaban huCRlg(L) y -(C).

(D) Colocalización de CRlg con CD68 en células de Kupffer hepáticas. Se realizó la inmunotinción en secciones obtenidas a partir de hígado humano y de ratón usando anti-CRlg monoclonal (3C9) humano y 14G6 ratón), y anticuerpos anti-CD68 monoclonales.

30 Figura 51. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CRlg en leucocitos de sangre periférica y análisis de unión de fragmentos C3 o partículas opsonizadas con C3 a células CHO que expresan CRlg.

35 (A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CRlg en leucocitos periféricos humanos y de ratón.
(B) Unión de fragmentos C3 solubles o patógenos opsonizados con complemento a células CHO que expresan CRlg murino, pero no a células CHO que expresan JAM-2. Las células en suspensión se incubaron con partículas opsonizadas con el complemento marcadas con A488 con rotación continua durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces y la unión de las partículas se controló por análisis de citometría de flujo. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

40 Figura 52. La proteína CRlg soluble y expresada en la superficie celular se une a fragmentos de C3 en solución o depositados sobre la superficie celular.

45 (A) Las células de Jurkat transfectadas con CRlg(L) (Jurkat-CRlg), pero no las células Jurkat transfectadas con vector vacío (Jurkat-control), forman rosetas con glóbulos rojos de oveja opsonizados con C3 e IgM (E-IgM). El histograma (panel izquierdo) muestra la expresión de CRlg en células Jurkat transfectadas de un modo estable con CRlg(L). Los E-IgM opsonizados con suero C3 deficiente (C3-) o C3 suficiente (C3+) se mezclaron con CRlg o con células Jurkat transfectadas con control vector durante 1 hora. El experimento fue representativo de tres experimentos independientes.

50 (B) La unión de CRlg(L)-Fc a glóbulos rojos de oveja opsonizados con IgM (E-IgM) es dependiente de la presencia de C3 en suero. Los E-IgM se opsonizaron con suero humano empobrecido en C3 al cual se añadieron concentraciones en aumento de C3 humano purificado. Los E-IgM se incubaron posteriormente con una proteína de fusión huCRlg(L)-Fc que, a su vez, se detectó con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano detectado por citometría de flujo. El experimento fue representativo de tres experimentos independientes.

55 (C) ELISA que muestra la unión de CRlg(L)- y CRlg(C)-Fc a C3b e iC3b. Se añadieron concentraciones en aumento de las proteínas de fusión huCRlg(L)- y huCRlg(C)-Fc a placas maxisorb cubiertas con C3b e iC3b purificados. La unión se detectó usando un anticuerpo anti-huFc conjugado con HRPO. Los resultados que se muestran son representativos de 4 experimentos independientes que usan distintos lotes de proteínas de fusión y componentes del complemento purificados.

60 (D) Datos de cinética de unión que muestran dímeros de C3b solubles que se unen a huCRlg(L)-Fc. La afinidad de C3b por las proteínas de fusión de CRlg se determinó usando resonancia de plasmón superficial. Las proteínas CRlg se capturaron en una microplaca detectora CM5 mediante acoplamiento con aminos de un anticuerpo dirigido contra la etiqueta de fusión Fc. El C3b dimerico se inyectó después durante un tiempo suficiente hasta alcanzar la saturación. Se calculó la Kd a partir de una curva de unión que muestra la
65

respuesta en el equilibrio representada gráficamente frente a la concentración. Los dímeros de C3b se unen a huCRIg(C) con una afinidad calculada de 44 nM y a huCRIg(L) con una afinidad de 131 nM.

(E) CRIg expresado en la superficie celular se une al dímero de C3b marcado con A488 (C3b)2) pero no al C3 nativo. El panel izquierdo muestra los niveles de expresión de huCRIg(L) en células THP-1 transfectadas mediante análisis de citometría de flujo. (C3b)2 muestra la unión saturable a células THP-1 transfectadas con CRIg. La unión de (C3b)2 a células THP-1 transfectadas CRIg compitió con C3b2, C3b y el dominio extracelular de CRIg (DEC-CRIg), pero no por C3. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

3

Figura 53. Generación y caracterización de ratones CRIg genosuprimidos (*ko*, *knock out*)

(A) Generación de un vector de direccionamiento que se usa para la recombinación homóloga en células ME (madre embrionarias)

(B) Confirmación por transferencia de Southern de la recombinación homóloga del alelo CRIg en la descendencia de hembras heterocigotas de ratones quiméricos cruzados con ratones ts (de tipo silvestre)

(C) Comparación de números de leucocitos en la sangre periférica de ratones macho y hembra de ts y ko.

(D) Análisis FACS que muestra la ausencia de expresión de CR1, CR2 y CD11c en CK.

(E) Análisis FACS de unión de C3-A488 y C3c-A488 a las CK de ts y ko.

Figura 54. La expresión de CRIg en las células de Kupffer es necesaria para que se produzca la unión de C3b e iC3b

(A) La proteína CRIg está ausente en macrófagos obtenidos de ratones CRIg KO. Macrófagos peritoneales obtenidos de ratones CRIg ts, het o ko se incubaron con un AcM anti-muCRIg (14G6; panel izquierdo). Las células de Kupffer (CK) obtenidas de ratones CRIg ts y ko se incubaron con el anticuerpo 14G6 y se analizaron por citometría de flujo.

(B) Niveles de expresión de CD11b y CD18, las cadenas alfa y beta del receptor del complemento 3 y Crry son similares en las células de Kupffer obtenidas de ratones CRIg ts y CRIg ko. Las células de Kupffer aisladas de ratones CRIg ts o ko se incubaron con anticuerpos contra CD11b, CD18 y Crry y se analizaron por citometría de flujo.

(C) Las células de Kupffer aisladas de ratones CRIg ts o ko se incubaron con suero de ratón activado (activado a través de incubaciones durante 30 minutos a 37 °C), C3b, (C3b)2 e iC3b. La unión de los componentes del complemento purificados a la superficie celular se detectó con un anticuerpo policlonal que reconoce los diversos fragmentos derivados de C3. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos.

(D) Las CK aisladas de ratones CRIg ko muestran disminución de la formación de rosetas con glóbulos rojos de oveja recubiertos con IgM (E-IgM) opsonizados en suero de ratón con suficiente C3. Las CK aisladas de hígados de ratones CRIg ts y ko se incubaron con E-IgM opsonizados con el C3 del complemento durante 30 minutos en presencia de IgG control o del anticuerpo bloqueante anti-CR3 (M1/70). Se fijaron las células y se contó el número de CK que formaban rosetas con E-IgM y se expresó como un porcentaje del número total de CK * = $p < 0,05$. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes.

Figura 55. CRIg en células de Kupffer recicladas

(A) células de Kupffer (CK) de ratones C3 ts (paneles 1, 3, 4 y 6) o C3 ko (paneles 2, 5) se incubaron con anticuerpo anti-CRIg marcado con A488 (14G6) y (C3b)2 durante una hora a 4 °C (paneles de 1-3) o durante 10 minutos a 37 °C (paneles 4-6). Las células se transfirieron posteriormente a 4 °C y se incubaron con anticuerpo anti-A488 (histograma en rojo) o sin anticuerpo (histograma en negro) para distinguir el anti-CRIg o C3b expresado en el citoplasma del de la superficie celular.

(B) Internalización y co-localización de CRIg y C3b en las CK CRIg ts, pero no CRIg ko. CK aisladas de hígados de ratones CRIg ts y ko se cultivaron durante 2 días en portaobjetos con cámaras y se incubaron con anticuerpos anti-CRIg conjugados con A455 y C3b conjugado con A488 durante 30 minutos a 37 °C, se montaron y se realizaron fotografías.

(C) Los anticuerpos de CRIg, pero no los de Lamp1, se reciclan a la superficie celular. Las células de Kupffer se cargaron con anticuerpos anti-muCRIg o anti-muLamp1 conjugados con A488 durante 10 minutos a 37 °C, se lavaron y posteriormente se incubaron a 37 °C durante los periodos de tiempo indicados en presencia de anticuerpo de desactivación anti-A488. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 56. CRIg se expresa en endosomas de reciclaje que se acumulan en sitios de ingestión de partículas.

(A) El CRIg expresado en la superficie celular se localiza en las ondulaciones de las membranas positivas para F-actina. Los cultivos de macrófagos derivados de monocitos se incubaron durante 7 días a 4 °C con el AcM anti-CRIg A488 conjugado con A488 3C9 (A1 y canal verde en A3) y Alexa 546-faloidina (A2 y canal rojo en A3). Las cabezas de flecha indican ondulaciones de membrana donde la tinción tanto de CRIg como de la

actina fueron más intensas que en el resto de la superficie celular (amarillo en las imágenes combinadas en A3). La barra de escala es de 20 μ m.

(B) CRlg y C3b se colocan con transferrina en endosomas de reciclaje. Los macrófagos se incubaron durante 1 hora en hielo con CRlg-A488 (B1, canal verde en B4) o C30A488 (B2, canal rojo en B4) después se continuó durante 10 minutos a 37 °C en presencia de A647-transferrina (B3, canal azul en B4). Escala de barras = 20 μ m.

(C) CRlg se acumula en la copa fagocítica y en la membrana de fagosoma. Los macrófagos se incubaron con glóbulos rojos recubiertos con IgM opsonizados con suero con suficiente C3 durante 10 minutos (C1-4) o 2 horas (C5-8) a 37 °C en presencia de transferrina marcada con A647 (C2, 6 y canal azul C4, 8). Las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron posteriormente con anticuerpos anti-CRlg policlonales (C1, 2 y canal verde en C4, 5) y anticuerpo contra LAMP-1 conjugado con A555 (C3, 7 y canal rojo en C4, 8).

Figura 57. Tránsito de CRlg en macrófagos derivados de monocitos humanos.

(A) Representación gráfica de FACS que muestra la unión saturable de C3b-A488 a CRlg en MDM de 7 días. (B) Los MDM se pulsaron durante 10 minutos a 37 °C con anticuerpo anti-CRlg y C3b-A488 en presencia de un exceso molar de 10 veces de huCRlg(L)-DEC. La unión y captación del anticuerpo anti-CRlg fue específica para CRlg dado que podía suprimirse por co-incubación del anticuerpo con un exceso molar de 10 veces de CRlg-DEC (panel 1) dejando al mismo tiempo intacta la captación de transferrina (panel 2).

(C) Los MDM estuvieron durante 20 h a 37 °C en presencia de inhibidores de proteasa lisosomal, después las células se lavaron, se fijaron con PFA al 1 % y el anticuerpo captado se detectó con anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (C panel 1, y canal rojo en panel 3). Las células se co-tiñeron en 10 μ g/ml de anti-CRlg de conejo 6F1 seguido de anti conejo - FITC para detectar la distribución de CRlg total (C panel 2 y canal verde en panel C 3). El anticuerpo captado se solapaba casi completamente con la señal endógena de CRlg (amarillo en la imagen combinada en panel C3), indicando que la captación del anticuerpo no influye en el tránsito de CRlg. La barra de escala es de 20 μ m y 5 μ m en el inserto de 4x aumentos de las regiones en recuadro mostradas en la parte inferior derecha de cada canal. Los macrófagos humanos del panel C4 se incubaron en suero empobrecido en C3 durante 13 horas, después se fijaron y se marcaron con F1 anti-CRlg de conejo y FITC anti-conejo. La distribución de CRlg fue esencialmente idéntica a la en suero con suficiente C3, solapando ambas casi completamente con el marcador de reciclaje endosomal transferrina (datos no mostrados). La barra de escala es de 20 μ m.

(D) Los MDM se incubaron con 1 μ g/ml de anti-CRlg-A488 (panel 1), transferrina-A647 (panel 2) durante 10 minutos a 37 °C, se fijaron en PFA al 4 %, se permeabilizaron con tampón de saponina y se incubaron con anti-Lamp-1-A555 humano de ratón (panel 3). Las flechas indican la co-localización de CRlg y la transferencia en el compartimento de reciclaje.

(E) Los MDM se incubaron con 1 μ g/ml de anti-CRlg-A488 (panel 1, canal verde en panel 4), transferrina-A647 (panel 2, canal azul en panel 4) durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron y se incubaron con glóbulos rojos de oveja GRO, panel 3, canal rojo en panel 4) opsonizados con complemento C3, teñidos con PKH (GRSO, panel 3, canal rojo en el panel 4) a una relación de 1:10 de macrófagos : GRO.

Figura 58. Los ratones que carecen de CRlg son susceptibles a infección por *Listeria monocytogenes* (LM).

(A) Curvas de supervivencia de hembras de ratones CRlg de tipo silvestre y CRlg ko infectadas con las dosis de LM indicadas después de inyección en la vena lateral de la cola, n = 5-7 por grupo. Análisis estadístico (Wilcoxon): ts frente ko p<0,005 para 2 x 10⁴ unidades formadoras de colonias (UFC), p<0,0001 para 5 x 10⁴ y 2 x 10⁵ UFC.

(B) Análisis de recuentos bacterianos en corazón, hígado, sangre y bazo 10 minutos después de infección por LM (2 x 10⁷ UFC, n= 5 por grupo). Análisis estadístico (ensayo de la t de muestras relacionadas): **p<0,01, *p<0,05.

(C) Concentraciones aumentadas de citocinas y quimiocinas en el suero de ratones CRlg ko un día después de las infecciones por LM. Análisis estadístico (ensayo de la t de muestras no relacionadas): ***p<0,001.

(D) Captación reducida de LM-A488 en CK en ratones CRlg ko. Los ratones se infectaron con 2 x 10⁷ LM-A488. Una hora más tarde, los hígados se perfundieron, se incubaron con anticuerpos contra F4/80 y se analizaron por citometría de flujo. Las CK F4/80 positivas se clasificaron posteriormente mediante FACS y se recogieron en portaobjetos recubiertos con poli-1-lisina para su observación al microscopio de fluorescencia. El número de LM-A488 internalizado se contó en un microscopio confocal y se calculó el índice fagocítico. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos.

(E) Los ratones CRlg tienen una eliminación reducida de LM de la circulación. Los ratones ko sencillos o dobles para CRlg y C3 a los ratones recibieron una inyección i.v. de 2 x 10⁷ UFC de LM. Diez minutos después de la infección se contaron las UFC en sangre. En presencia de C3, los ratones CRlg ko tuvieron una eliminación significativamente reducida de LM de la circulación (p<0,001). En ausencia de C3, no hubo diferencias significativas en la eliminación de LM en ratones CRlg ts o ko.

La Figura 59 muestra la secuencia de nucleótidos de una fusión CRlg(corto)humano-IgG. (SEC ID N°: 20).

La Figura 60 muestra la secuencia de nucleótidos de una fusión CRlg(largo)humano-IgG (SEC ID N°: 21).

La Figura 61 ilustra la confluencia de CRlg (STlgMA)-Fc en dos construcciones diferentes, ambas de las cuales están insertadas en un vector pK5 en un sitio ClaI-XbaI.

La Figura 62 muestra que la proteína de fusión muCRlg-Fc (pero no la proteína de fusión Fc control) inhibe la eliminación de LM de la circulación en células de CRlg ts pero no en las CRlg ko. Ratones CRlg ts y ko se trataron con 2 inyecciones de 12 mg/kg de proteínas de fusión muCRlg-Fc o control-Fc 24 h y 16 h antes de la inyección i.v. con 2×10^7 UFC de LM. Las UFC en sangre se contaron 10 minutos después de la infección. Los ratones CRlg ts que se trataron con muCRlg-Fc tuvieron una eliminación significativamente reducida de LM de la circulación en comparación con los ratones de ts tratados con control-Fc ($p < 0,001$, ensayo de la *t* de Student de muestras no relacionadas). En los ratones CRlg ko el tratamiento con muCRlg-Fc no tuvo efecto adverso sobre la eliminación de LM.

Figura 63. Inhibición de la hemólisis inmunitaria mediada por el complemento con moléculas de huCRlg. A. Inhibición de la hemólisis de GRC (glóbulos rojos de conejo) de suero de mono *Cynomolgo* usando proteínas de fusión hCRlg-corto y hCRlg-largo. B. Inhibición de la hemólisis de RRBC de suero de mono *Cynomolgo* usando hCRlg-largo DEC.

Figura 64. Inhibición de la hemólisis de suero humano con hCRlg-largo en dos experimentos distintos.

Figura 65. Inhibición de la hemólisis de suero humano con las proteínas de fusión hCRlg-corto-Fc y CRlg-largo-Fc.

Figura 66. Inhibición de la hemólisis de suero humano con hCRlg-largo-DEC y hCRlg-corto-DEC, respectivamente.

La Figura 67 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica huCRlg-largo-Fc (construcción "sin tallo") (SEC ID N°: 25).

La Figura 68 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica huCRlg-largo-Fc que tiene un "tallo" insertado entre el dominio transmembrana de CRlg y la parte Fc (SEC ID N°: 26).

La Figura 69 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica huCRlg-corto-Fc (construcción "sin tallo") (SEC ID N°: 27).

La Figura 70 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica huCRlg-corto-Fc que tiene un "tallo" insertado entre el dominio transmembrana de CRlg y la parte Fc (SEC ID N°: 28).

Las Figuras 71 A y B muestran los resultados de estudios de NVC en ratón descritos en el Ejemplo 23.

Descripción detallada de la realización preferida

I. Definiciones

Los términos "PRO362", "JAM4", "STlgMA" y "CRlg" se usan indistintamente, y se refieren a polipéptidos CRlg de secuencia nativa y variantes.

Un polipéptido CRlg de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido CRlg derivado de la naturaleza, sin importar su modo de preparación. Por lo tanto, un CRlg de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "CRlg de secuencia nativa", incluye específicamente formas de CRlg de origen natural truncadas o secretadas (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), las formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y las variantes alélicas de origen natural de CRlg. La secuencia nativa de los polipéptidos CRlg incluyen específicamente los 321 aminoácidos del polipéptido CRlg humano largo de SEC ID N°: 2 (que se muestra en la Figura 1), con o sin la secuencia señal de N terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, y con o sin ninguno o con todos los dominios transmembrana que están aproximadamente en las posiciones 277 a 307 de la SEC ID N°: 2. Los polipéptidos CRlg de secuencia nativa incluyen adicionalmente el polipéptido CRlg humano de longitud completa de 399 aminoácidos de longitud de SEC ID N°: 4 (huCRlg, o huCRlg-largo, que se muestra en las Figuras 2 y 5), con o sin una secuencia señal del N terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, con o sin uno o todos los dominios transmembrana que están aproximadamente en las posiciones de aminoácidos 277 a 307 de SEC ID N°: 4. En una realización aún adicional, el polipéptido de secuencia nativa de CRlg es la forma corta, de 305 aminoácidos, del CRlg humano (huCRlg-corto, SEC ID N°: 6, que se muestra en la Figura 3), con o sin una secuencia señal del N terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, y con o sin cualquiera o todos los dominios transmembrana que están aproximadamente en las posiciones de 183 a 213 de SEC ID N°: 6. En una realización diferente, el polipéptido CRlg de secuencia nativa es un polipéptido CRlg murino de longitud completa de 280 aminoácidos de longitud de SEC ID N°: 8 (muCRlg, que se muestra en las Figuras 4 y 5), con o sin una secuencia señal del N terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1 y con o sin ninguno o con todos los dominios transmembrana que están aproximadamente en las posiciones de aminoácidos 181 a 211 de SEC ID N°: 8. Los polipéptidos CRlg de otros animales no humanos, incluyendo primates superiores y mamíferos, se incluyen específicamente en esta definición.

"Variante de CRlg" significa un polipéptido CRlg activo, como se define a continuación, que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido CRlg de secuencia nativa, incluyendo, sin limitación, el huCRlg truncado en el C terminal de 321 aminoácidos (SEC ID N°: 2), el huCRlg de longitud completa (SEC ID N°: 4), el huCRlg-corto (SEC ID N°: 6) y el muCRlg (SEC ID N°: 8), cada uno de ellos con o sin la metionina de iniciación de N terminal, con o sin la secuencia señal de N terminal, con o sin todos o parte de los dominios transmembrana y con o sin el dominio intracelular. En una realización particular, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente

el 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido maduro de longitud completa de dentro de la secuencia de la SEC ID N°: 2. En otra realización, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente el 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido maduro de longitud completa de dentro de la secuencia de SEC ID N°: 4. En otra realización más, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente el 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido maduro de longitud completa de dentro de la secuencia de SEC ID N°: 6. En una realización adicional más, la variante de CRlg tiene al menos aproximadamente el 80 % de homología de secuencia de aminoácidos con el polipéptido maduro de longitud completa de dentro de la secuencia de SEC ID N°: 8. Dichas variantes del polipéptido CRlg incluyen, por ejemplo, polipéptidos CRlg en los que se insertan, sustituyen y/o delecionan, uno o más restos de aminoácidos, en el extremo N o C de la secuencia de las SEC ID Nos: 2, 4, 6 u 8. Otras variantes tienen uno o más aminoácidos insertados, sustituidos y/o delecionados dentro de las regiones transmembrana de las secuencias polipeptídicas indicadas.

Normalmente, una variante de CRlg tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 %, o una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85 %, o una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90 %, o una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, o una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 98 %, o una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 99 % con la secuencia de aminoácidos madura de dentro de las SEC ID Nos: 2, 4, 6 u 8. Preferentemente, el grado más alto de identidad de secuencia se produce en los dominios extracelulares (DEC) (los aminoácidos 1 a aproximadamente 21 a X de SEC ID N°: 2 o 4, en los que X es cualquier resto de aminoácido de la posición 271 a la 281; o los aminoácidos 1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID N°: 6, en los que X es cualquier resto de aminoácido de la posición 178 a la 186, o los aminoácidos 1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID N°: 8, en los que X es cualquier resto de aminoácido de la posición 176 a la 184).

El “dominio extracelular” o “DEC” de CRlg (PRO362) se refiere a una forma del polipéptido CRlg, que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático de las moléculas de longitud completa respectivas. Normalmente, los DEC de CRlg tendrán menos del 1 % de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmáticos y preferentemente, tendrán menos de 0,5 % de dichos dominios. Tal como se explica anteriormente, opcionalmente, los DEC de CRlg comprenderán los restos de aminoácidos 1 o de aproximadamente 21 a X de las SEC ID Nos: 2, 4, 6 u 8, en los que X es cualquier aminoácido de aproximadamente la posición 271 a la 281 en las SEC ID Nos: 2 o 4, cualquier aminoácido de aproximadamente la posición 178 a 186 en la SEC ID N°: 6, y cualquier aminoácido de aproximadamente la posición 176 a la 184 en la SEC ID N°: 8.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de CRlg (PRO362) identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con respecto a los restos de aminoácidos en la secuencia de CRlg, respectivamente, después de alinear las secuencias y de introducir los huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna de las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede realizarse de diversos modos que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, tales como los programas informáticos BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se comparan. La identidad de secuencia se calcula después respecto a la secuencia más larga, es decir incluso si una secuencia más corta muestra una identidad de secuencia del 100 % con respecto a una parte de una secuencia más larga, la identidad de secuencia total será menor del 100 %.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias codificantes de CRlg (PRO362) identificadas en el presente documento (por ejemplo, ADN45416) se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con respecto a los nucleótidos en la secuencia codificante de CRlg, respectivamente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede realizarse de diversos modos que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquiera de los algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se comparan. La identidad de secuencia se calcula después con respecto a la secuencia más larga, es decir, incluso si una secuencia más corta muestra una identidad de secuencia del 100 % con respecto a una parte de una secuencia más larga, la identidad de secuencia total será menor del 100 %.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico es distinta en forma o configuración a la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe naturalmente en las células. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de

ácido nucleico contenidas en células que normalmente expresan un polipéptido codificado en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica un polipéptido CRlg, es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual se asocia normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica CRlg. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido CRlg es distinta en forma o configuración a la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido CRlg se distinguen de la molécula o moléculas de ácido nucleico codificantes en tanto estas existen en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica CRlg incluye moléculas de ácido nucleico que codifican CRlg contenidas en células que normalmente expresan CRlg en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

La expresión “enfermedad asociada al complemento” se usa en el presente documento en el más amplio sentido e incluye todas las enfermedades y afecciones patológicas cuya patogénesis implica anomalías en la activación del sistema de complemento, tales como, por ejemplo, las deficiencias del complemento. La expresión incluye específicamente enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición de la convertasa de C3. La expresión adicionalmente incluye las enfermedades y afecciones patológicas que se benefician de la inhibición, incluyendo inhibición selectiva, de la ruta alternativa del complemento.

La expresión “afección ocular asociada al complemento” se usa en el presente documento en el más amplio sentido e incluye todas las afecciones y enfermedades oculares cuya patología implica el complemento, incluyendo las rutas alternativa y clásica, y en particular la ruta alternativa del complemento. Dentro de este grupo se incluyen específicamente todas las enfermedades y afecciones oculares asociadas con la ruta alternativa, cuya aparición, desarrollo o progresión puede controlarse mediante la inhibición de la ruta alternativa. Las afecciones oculares asociadas al complemento incluyen, sin limitación, enfermedades maculares degenerativas, tales como todas las fases de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), incluyendo las formas seca y húmeda (no exudativa y exudativa), neovascularización coroidal (NVC), uveítis, retinopatía diabética y otras relacionadas con isquemia, endoftalmitis, y otras enfermedades neovasculares intraoculares, tales como el edema macular diabético, la miopía patológica, LA enfermedad de von Hippel-Lindau, la histoplasmosis ocular, Oclusión de la Vena Central de la Retina (OVCR), neovascularización corneal y neovascularización retiniana. Un grupo preferido de afecciones oculares asociadas al complemento incluye la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), incluyendo la DMRE no exudativa (húmeda) y exudativa (seca o atrófica), la neovascularización coroidal (NVC), la retinopatía diabética (RD) y la endoftalmitis.

El “tratamiento” es 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 las medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesitan el tratamiento incluyen a las que ya tienen el trastorno así como a las que se tendrá que prevenir el trastorno. En el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta de un componente de la respuesta inmunitaria, o hacer que la enfermedad sea más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, etc. En el tratamiento de una enfermedad asociada al complemento, el tratamiento podría, por ejemplo, prevenir o ralentizar la progresión de una enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento de una afección ocular asociada al complemento incluye específicamente la prevención, inhibición, o ralentización del desarrollo de la afección, o de la progresión de una fase de la afección a otra fase más avanzada, o en una afección relacionada más grave.

La “patología” de una enfermedad, tal como una enfermedad asociada al complemento, incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Estos incluyen, sin limitación, el crecimiento celular anómalo o incontrolable (de células neutrófilas, eosinófilas, monocíticas, linfocíticas), la producción de anticuerpos, la producción de autoanticuerpos, la producción de complemento, la interferencia con el funcionamiento normal de células adyacentes, la liberación de citocinas u otros productos secretorios a niveles anómalos, la supresión o agravamiento de cualquier respuesta inflamatoria o inmunológica, infiltración de células inflamatorias (neutrófilas, eosinófilas, monocíticas, linfocíticas) en los espacios celulares, la formación de drusas, la pérdida de visión, etc.

El término “mamífero”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos, primates no humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos y hurones, etc. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano, o un primate no humano, más preferentemente un ser humano.

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

El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas las linfocinas, monocinas y hormonas

polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona de crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionilo, y la hormona de crecimiento bovino, la hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormonas glucoproteicas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH), el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento de fibroblastos, la prolactina, el lactógeno placentario, el factor de necrosis tumoral α y β , y la sustancia inhibidora mulleriana, el péptido asociado a la gonadotropina de ratón, la inhibina, la activina, el factor de crecimiento endotelial vascular, la integrina, la trombopoyetina (TPO), los factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β , factor de crecimiento plaquetario, los factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- α y TNF- β , el factor de crecimiento similar a la insulina I y II, la eritropoyetina (EPO), los factores osteoinductivos, los interferones tales como interferón- α , β , y γ ; los factores estimuladores de colonias (CSF) tales como el CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y el CSF de granulocitos (G-CSF), las interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o del cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad de CRIg activa, de agonistas y antagonistas de CRIg que se requiere para conseguir una mejora medible en el estado, por ejemplo, patología, de la enfermedad o afección a la que se dirigen, tales como, por ejemplo, una enfermedad o afección (ocular) asociada al complemento, o cáncer.

La expresión “secuencias control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está, “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está en una posición de modo que facilite la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se realiza uniendo en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación la determina fácilmente un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, de la temperatura de lavado, y de la concentración salina. En general, sondas más largas requieren temperaturas más altas para el emparejamiento apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a emparejarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. A mayor grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, se puede usar mayor temperatura relativa. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas podrían tender a hacer que las condiciones de reacción sean más rigurosas, mientras que las temperaturas más bajas las reducirían. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, *Current Protocol in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las “condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se definen en el presente documento, pueden identificarse por aquellas que: (1) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50 % de formamida (v/v) con 0,1 % de albúmina del suero bovino/0,1 % de Ficoll/ 0,1 % de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean 50 % de formamida, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonido (50 μ g/ml), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50 % de formamida a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

Las “condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse tal como describen Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de soluciones de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones de moderadamente rigurosas es la incubación durante toda la

noche a 37 °C en una solución que comprende: 20 % de formamida, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, 10 % de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. siempre que sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

La expresión "epítipo etiquetado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de la invención fusionado a un "polipéptido con etiqueta". El polipéptido con etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede fabricar un anticuerpo, aunque es lo suficientemente corto como para no interferir con la actividad del polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido con etiqueta también es preferentemente bastante exclusivo, de modo que el anticuerpo no reacciona sustancialmente en cruzado con otros epítipos. Los polipéptidos con etiqueta adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

"Activo" o "actividad" en el contexto de las variantes de los polipéptidos de CRIg de la invención, se refiere a una forma (o formas) de dichos polipéptidos que conserva la actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo o de origen natural de la invención. Una actividad biológica preferida es la capacidad de unirse a C3b, y/o de afectar al complemento o a la activación del complemento, en particular, inhibir la ruta alternativa del complemento y/o la convertasa C3. La inhibición de la convertasa C3 puede medirse, por ejemplo, midiendo la inhibición de la renovación de C3 en suero normal durante la artritis inducida por colágeno - o por anticuerpos-, o midiendo la inhibición de la deposición de C3 en articulaciones artríticas.

La "actividad biológica" en el contexto de un anticuerpo, polipéptido u otra molécula que imite la actividad biológica de CRIg, y que pueda identificarse mediante los ensayos de exploración divulgados en el presente documento (por ejemplo, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, un péptido, etc.) se refiere, en parte, a la capacidad de dichas moléculas para unirse a C3b y/o de afectar al complemento o a la activación del complemento, en particular, inhibir la ruta alternativa del complemento y/o convertasa C3.

El término "agonista" de CRIg se usa en el más amplio sentido, e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica cualitativa (tal como se define anteriormente en el presente documento) de un polipéptido de secuencia nativa de CRIg. Estos agonistas de CRIg incluyen específicamente CRIg-Ig, por ejemplo, polipéptidos de fusión de CRIg-Fc. Preferentemente, la actividad biológica es el bloqueo de una ruta del complemento, especialmente de la ruta alternativa del complemento.

El término "antagonista" se usa en el más amplio sentido, e incluye cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba, o neutralice una actividad biológica cualitativa de un polipéptido nativo, tal como un polipéptido de secuencia nativa de CRIg.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

Los "anticuerpos" (Acs) y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que pueden carecer de especificidad antigénica. Los polipéptidos del último tipo, por ejemplo, los produce, a bajos niveles, el sistema linfático y, a altos niveles, los mielomas. El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido e incluye específicamente, sin limitación, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Los "anticuerpos nativos" y las "inmunoglobulinas nativas" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y cadena ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V_H) seguido de diversos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene, en un extremo, un dominio variable (V_L) y en su otro extremo un dominio constante; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su

antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión antigénica o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. En particular, los ejemplos de fragmentos de anticuerpo contenidos en la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más restos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios VL y HL de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (vii) las regiones CDR aisladas; (viii) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, Fv monocatenario; Fvmc) (Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988); y Huston *et al.*, PNAS (EE.UU.) 85: 5879-5883 (1988)); (x) los "diacuerpos" con dos sitios de unión antigénica, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404,097; WO 93111161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 6444-6448 (1993)); (xi) los "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de unión antigénica (Zapata *et al.* Protein Eng. 8(10): 1057 1062 (1995); y Patente de Estados Unidos N° 5.641.870).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos sitios de unión antigénica idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión antigénica, y un fragmento "Fc" residual. La designación "Fc" refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación antigénica y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

El fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión antigénico completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera, en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión antigénico en la superficie del dímero V_H-V_L. En su conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión antigénica al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que solo comprende tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, aunque a una menor afinidad que la del sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH es la designación de Fab' en la que uno o más restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos entre fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basada en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Existente cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y algunas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan γ, μ, δ, α y ε, respectivamente. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

El "dominio CH2" de una región Fc de una IgG humana (también denominado dominio "Cg2") normalmente se extiende desde un resto de aminoácido que está aproximadamente en la posición 231 a un resto de aminoácido que está aproximadamente en la posición 340. El dominio CH2 es exclusivo ya que no se encuentra estrechamente emparejado con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de hidrato de carbono ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado con que el hidrato de carbono puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento entre dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Malec. Immunol. 22: 161-206 (1985). El dominio CH2 del presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o un dominio CH2 variante.

El “dominio CH3” comprende el tramo de restos del extremo C en un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 341 a un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 del presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio de CH3 con una “protuberancia” introducida en una cadena del mismo y una “cavidad” correspondiente introducida en la otra cadena del mismo; véase la Patente de Estados Unidos Nº 5.821.333. Dichos dominios CH3 variantes pueden usarse para fabricar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos), como se describe en el presente documento.

La “región bisagra” se define generalmente como una extensión de aproximadamente la Glu216, o aproximadamente la Cys226, a aproximadamente la Pro230 de la IgG1 humana (Burton, MoZee. Immunol.22: 161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último resto de cisteína formando enlaces S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra del presente documento puede ser una región bisagra de secuencia nativa o una región bisagra variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región bisagra variante generalmente conservan al menos un resto de cisteína por cadena polipeptídica, de modo que las dos cadenas polipeptídicas de la región bisagra variante pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida en el presente documento es una región bisagra humana de secuencia nativa, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 humana de secuencia nativa.

Una “región Fc funcional” posee al menos una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ejemplares incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; RCB), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de los anticuerpos.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza.

Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido, en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento poseerá generalmente, por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, o una identidad de secuencia de al menos 90 % con la misma, o una identidad de secuencia de al menos 95 % o más con la misma.

En el presente documento un “enlazador flexible” se refiere a un péptido que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos por uno o más enlaces peptídicos, y proporciona más libertad rotacional para dos polipéptidos (tales como dos regiones Fd) unidos de ese modo. Dicha libertad rotacional permite que dos o más sitios de unión antigénica, unidos entre sí por el enlazador flexible, accedan al antígeno (o antígenos) diana más eficazmente. Los ejemplos de secuencias peptídicas enlazadoras flexibles incluyen gly-ser, gly-ser-gly-ser, ala-ser, y gly-gly-gly-ser.

Un polipéptido “aislado”, tal como un anticuerpo, es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido, incluyendo anticuerpos, se purificará (1) hasta más de 95% en peso del anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y muy preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. El compuesto aislado, por ejemplo, anticuerpo u otro polipéptido, incluye el compuesto *in situ* con células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el compuesto aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La palabra “marcador”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente con un compuesto, por ejemplo, anticuerpo o polipéptido, para generar un compuesto “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes), o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato, que es detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el compuesto de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas englobadas en este documento incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polialcohol vinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas distintas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N° 4.275.149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo, que es útil para administrar a un mamífero un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 que se divulgan en el presente documento y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico). Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación bicapa, similar a la disposición lipídica de membranas biológicas.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulinas. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es generalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG- 1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Un "factor o agente angiogénico" es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de vasos sanguíneos y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos, incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de VEGF, P1GF, la familia PDGF, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los ligandos de TIE (Angiopoyetinas), efrinas, ANGPTL3, ANGPTL4, etc. También podría incluir factores que aceleran la cicatrización de heridas, tales como la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I), VIGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF- α y TGF- β . Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1 enumera factores angiogénicos); y Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003).

Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de las mismas, que inhiben la angiogénesis, la vasculogénesis, o la permeabilidad vascular indeseada, bien directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista contra un agente angiogénico tal como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF, anticuerpos contra receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores nativos de la angiogénesis, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003).

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar (incluyendo la prevención) una enfermedad o trastorno en un mamífero. Por lo tanto, en el caso de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) o de la neovascularización coroidal (NVC), la cantidad eficaz del fármaco puede reducir o prevenir la pérdida de visión. Para la terapia de la DMRE, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, mediante uno o más de lo siguiente: evaluar el cambio medio en la mejor agudeza visual corregida (MAVC) desde el inicio en un momento deseado, evaluar la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras de agudeza visual en un tiempo deseado en comparación con el dato inicial, evaluar la proporción de sujetos que ganan más de o igual a 15 letras en agudeza visual en un tiempo deseado en comparación con el dato inicial, evaluar la proporción de sujetos con una agudeza visual de Snellen equivalente a 20/2000 o peor en un momento deseado, evaluar el Cuestionario NEI sobre Funcionamiento Visual, evaluar el tamaño de la NVC y la cantidad de pérdida de NVC en un momento deseado, tal como se evalúa mediante angiografía con fluoresceína, etc. Si la indicación es la prevención de la progresión de DMRE seca a húmeda, o de DMRE a CMV, la cantidad eficaz del fármaco puede inhibir, ralentizar, o bloquear parcial o totalmente dicha progresión. En este caso, la determinación de la cantidad eficaz implica graduar la enfermedad, controlar la evolución de la progresión de la enfermedad, y ajustar la dosificación siempre que sea necesario con el fin de conseguir el resultado deseado.

II. Descripción detallada

La presente invención concierne al uso de un nuevo receptor asociado a macrófagos con homología con el antígeno A33 y JAM1, que se clonó de una biblioteca de pulmones fetales y se identificó como un miembro de la superfamilia de Ig de un solo dominio transmembrana asociado con macrófagos (STigMA, por las siglas en inglés *single transmembrane Ig superfamily member macrophage associated*) o polipéptido Receptor del Complemento de la

familia de las Inmunoglobulinas (CRIg, por las siglas en inglés *Complement Receptor of the Immunoglobulin family polypeptide*). El CRIg nativo humano se expresa como dos variantes de corte y empalme, una que contiene un dominio similar a IgV en el extremo N y un dominio similar a IgC2 en el extremo C y una forma de corte y empalme que carece del dominio del extremo C (SEC ID Nos: 4 y 6, respectivamente). Ambos receptores tienen un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, que contiene restos de tirosina que están fosforilados de manera constitutiva en macrófagos *in vitro*. Se encontró un homólogo de ratón con un 67 % de homología de secuencia con un CRIg humano (SEC ID N°: 8). El polipéptido CRIg humano de longitud completa también tiene una versión más corta, que carece de un segmento en el extremo N (SEC ID N°: 2).

Tal como se muestra más adelante en los Ejemplos, CRIg se une al C3b del complemento e inhibe la convertasa C3. CRIg se expresa selectivamente en macrófagos residentes en tejidos, y su expresión se regula positivamente con dexametasona e IL-10, y se regula negativamente con LPS e IFN- γ , e inhibe la artritis inducida por colágeno- y anticuerpo- independiente de respuestas de células B o T.

Además se ha encontrado que CRIg se expresa altamente en células de Kupffer, se une a las opsoninas de C3b e iC3b y se requiere para la eliminación rápida de patógenos en la circulación. Estructuralmente, CRIg difiere de los receptores del complemento conocidos en que carece de secuencias de repetición consenso cortas de unión a C3b y C4b en CR1 y CR2, así como de los dominios similares a integrina presentes en C3 y CR4. Mientras que los receptores del complemento CR1-4 se expresan en una amplia variedad de tipos de células, la expresión de CRIg está confinada a macrófagos residentes en tejidos, incluyendo las células de Kupffer hepáticas.

Estudios de empobrecimiento realizados han establecido un papel para las células de Kupffer en la eliminación rápida, dependiente de C3, de *Listeria* inicialmente durante una infección (Kaufmann, Annu Rev. Immunol. 11: 129-163 (1993); Gregory *et al.*, J. Immunol. 168: 308-315 (2002)) pero los receptores implicados en este proceso no se han identificado hasta ahora. Los estudios presentados en los ejemplos más adelante demuestran que el CRIg expresado por macrófagos se une a C3b e iC3b depositado en la superficie del patógeno. Debido a esta actividad de unión doble a C3b y a iC3b, CRIg se requiere para la eliminación eficaz de *Listeria monocytogenes* (LM) opsonizada con ambos componentes de degradación de C3.

La importancia de CRIg en la eliminación hepática rápida de las partículas opsonizadas con C3 se sustenta adicionalmente por la imposibilidad de los ratones CRIg *knock out* (ko) de eliminar eficazmente de la circulación la bacteria LM opsonizada con C3, conduciendo a elevar la carga de patógenos en diversos órganos y a aumentar la mortalidad. En ausencia de C3, los ratones CRIg ko de tipo silvestre (ts) eliminaron *Listeria* igualmente bien, indicando la dependencia de la función de CRIg en presencia de C3.

El papel de los receptores del complemento CR1-4 en la eliminación de LM mediante células de Kupffer hepáticas no se ha establecido bien. CR1 y CR2 están ausentes en macrófagos residentes en tejidos y se expresan predominantemente en células dendríticas foliculares y en células B donde estos ejercen un papel en la regulación de las respuestas de células T y B (Krych-Goldber y Atkinson, Immunol. Rev. 180: 112-122 (2001); Molina *et al.*, J. Exp. Med. 175: 121-129 (1992)) y Ejemplos). CR3 se expresa a bajos niveles en las CK, pero ratones ko que carecen de la cadena beta común de CD18 tanto de CR3 como de CR4, dan como resultado receptores no funcionales que muestran susceptibilidad a infección más bien reducida en lugar de aumentada (Wu *et al.*, Infect. Immun. 71: 5986-5993 (2003)). Por lo tanto CRIg representa un componente principal del sistema fagocítico retículoendotelial en la eliminación rápida de las partículas opsonizadas con C3.

Además de su expresión en células de Kupffer hepáticas, CRIg está presente en subpoblaciones de macrófagos en diversos tejidos incluyendo el peritoneo, corazón, pulmón, glándula adrenal e intestino. Se sabe que estos macrófagos ejercer un papel principal en la fagocitosis de células muertas y restos celulares (Almeida *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1019: 135-140 (2004); Castellucci y Zaccheo, Prog. Clin. Biol. Res. 296: 443-451 (1989); Taylor *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 23: 901-944 (2005)). La expresión de CRIg en estos macrófagos residentes puede mediar la opsonofagocitosis dependiente del complemento de diversas partículas. Esto se sustenta por el hallazgo de que los ratones CRIg ko muestran reducción de LM en sus tejidos cardíacos y hepáticos a pesar del aumento de carga circulatoria de LM. Por lo tanto, CRIg representa un nuevo receptor expresado en macrófagos tisulares y actúa como un portal para la eliminación rápida de patógenos opsonizados por el complemento.

Los resultados presentados en los Ejemplos más adelante demuestran adicionalmente que CRIg se expresa en un conjunto intracelular de vesículas de reciclaje, asegurando de este modo un aporte continuo de CRIg en la superficie celular para que se produzca la unión a las partículas opsonizadas con C3. Además, endosomas que expresan CRIg se acumulan rápidamente en sitios de contacto de partículas donde pueden ayudar a suministrar membranas al fagosoma en formación. La importancia de CRIg en la fagocitosis de partículas opsonizadas con C3 se muestra por la incapacidad de las CK que carecen de CRIg para unirse a C3b e iC3b dando como resultado la fagocitosis reducida de *Listeria monocytogenes* opsonizada con C3 (véanse los Ejemplos).

La localización subcelular y el tránsito intracelular de CRIg difieren de la de los receptores de C3 del complemento conocidos. Mientras que CRIg se localiza en endosomas de reciclaje constitutivo, CR1, CR3 y CR4 se localizan en vesículas secretoras que se fusionan con la membrana plasmática tras la estimulación de las células con citocinas

(Sengelov *et al.*, J. Immunol. 153: 804-810 (1994); y Sengelov *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 15: 107-131 (1995)) e internalizan el ligando a través de un proceso macropinocítico solo después del entrecruzamiento del receptor (Carpentier *et al.*, Cell Regul. 2: 41-55 (1991); Brown *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 3: 76-82 (1991)). Como consecuencia, la expresión de CRlg en la superficie de las células está regulada negativamente después de la estimulación de las células, mientras que la expresión de CR1 y CR3 en la superficie celular aumenta después de la estimulación. Este aumento sirve como una etapa importante en la unión y la fagocitosis, y como CRlg, CR3 se concentra en la copa fagocítica y en el fagosoma circundante de las partículas opsonizadas con C3 (Aderem y Underhill, Annu. Rev. Immunol. 17: 593-623 (1999)). El reciclaje constitutivo y la endocitosis del ligando mediante CRlg en macrófagos en reposo es coherente con un papel en la unión de las partículas opsonizadas con el complemento durante la fase inicial de una infección bacteriana antes de una respuesta inflamatoria (por ejemplo, la acumulación de fagocitos activados), así como durante la eliminación de las partículas de la circulación en condiciones no inflamatorias.

El complemento juega un papel crucial en la defensa del organismo, y junto con otros componentes del sistema inmunitario, protege a los individuos de la invasión del organismo por patógenos. Sin embargo, el complemento también puede ocasionar daños a tejidos hospedadores si no está correctamente activado o controlado. La activación inapropiada del complemento está implicada en la patogénesis de una diversidad de enfermedades, denominadas enfermedades o trastornos asociados al complemento, tales como enfermedades del complejo inmunitario y autoinmunitarias, y diversas afecciones inflamatorias, incluyendo el daño tisular inflamatorio mediado por el complemento. La patología de las enfermedades asociadas al complemento varía, y puede implicar la activación del complemento durante un periodo de tiempo largo o corto, la activación de toda la cascada, de solamente una de las cascadas (por ejemplo, la ruta clásica o alternativa), solamente de algunos de los componentes de la cascada, etc. En algunas enfermedades las actividades biológicas de los fragmentos del complemento dan como resultado daño tisular y enfermedad. Por consiguiente, los inhibidores del complemento tienen un alto potencial terapéutico. Los inhibidores selectivos de la ruta alternativa serían ser particularmente útiles, dado que la eliminación de patógenos y otros organismos de la sangre a través de la ruta clásica permanecería intacta.

Se sabe que C3b opsoniza de manera covalente las superficies de microorganismos que invaden el organismo, y actúa como un ligando para receptores del complemento presentes en células fagocíticas, que finalmente conduce a la fagocitosis de los patógenos. En muchas situaciones patológicas, tales como las enumeradas anteriormente, el complemento se activará en las superficies celulares, incluyendo la pared vascular, el cartílago en las articulaciones, glomérulos renales o células que carecen de inhibidores del complemento intrínsecos. La activación del complemento conduce a inflamación causada por propiedades quimioatrayentes de las anafilotoxinas C3a y C5a y puede causar daños a las propias células generando un complejo de ataque a la membrana. Sin ceñirse a ninguna teoría particular, se cree que CRlg inhibe la convertasa C3 mediante la unión a C3b, previniendo o reduciendo de ese modo enfermedades mediadas por el complemento, cuyos ejemplos se han enumerado anteriormente en el presente documento.

Compuestos de la invención

1. Polipéptidos CRlg de secuencia nativa y variantes

La preparación de moléculas nativas de CRlg, junto con sus secuencias de ácidos nucleicos y de polipéptidos, se ha explicado anteriormente. El Ejemplo 1 muestra la clonación del huCRlg de longitud completa de SEC ID N°: 4. Los polipéptidos de CRlg pueden producirse cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de CRlg. Por supuesto, se contemplan métodos alternativos, bien conocidos en la técnica, que pueden emplearse para preparar CRlg. Por ejemplo, la secuencia de CRlg, o partes de la misma, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. Puede realizarse la síntesis *in vitro* de proteínas usando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sintetizador peptídico de Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas partes de CRlg pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir CRlg de longitud completa.

Las variantes de CRlg pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica un polipéptido CRlg de secuencia nativa, o por síntesis del polipéptido CRlg deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales de CRlg, tal como cambiando el número o la posición de sitios de glucosilación o alterando las características de anclaje a la membrana.

Pueden realizarse variaciones en los polipéptidos CRlg de secuencia nativa, descritos en el presente documento, usando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas y normas para realizar mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican un CRlg de secuencia nativa o variante que dan como

resultado un cambio en su secuencia de aminoácidos en comparación con un CRlg de secuencia nativa o variante correspondiente. Opcionalmente la variación es por sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido en uno o más de los dominios de un polipéptido CRlg de secuencia nativa de. Puede encontrarse una orientación en la determinación de qué resto de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar de modo adverso a la actividad deseada comparando la secuencia de CRlg con la de moléculas de proteínas homólogas conocidas y minimizando el número de cambios realizados en la secuencia de aminoácidos en regiones de alta homología.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazamiento de leucina por una serina, es decir, reemplazos de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando la actividad de las variantes resultantes en el ensayo *in vitro* descrito en los Ejemplos más adelante.

Las variaciones pueden realizarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis (dirigida) mediada por oligonucleótidos, mutagénesis de exploración con alanina, y por PCR. Para producir el ADN variante de CRlg puede realizarse mutagénesis dirigida [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res, 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de casete [Wells *et al.*, Gene, 34: 315 (1985)], mutagénesis de selección por restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

El análisis de exploración con aminoácidos también puede emplearse para identificar uno o más aminoácidos que pueden variar a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de exploración preferidos están los aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es generalmente un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere generalmente debido a que es el aminoácido más común. Adicionalmente, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones ocultas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de la alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

Se ha descubierto que la eliminación o la inactivación de toda, o de parte de, la región transmembrana y/o región citoplasmática no compromete la actividad biológica de CRlg. Por lo tanto, las variantes de CRlg con la región transmembrana y/o región citoplasmática delecionada/inactivada están específicamente dentro del ámbito del presente documento. De modo similar, la región IgC2 puede eliminarse sin comprometer la actividad biológica, tal como se demuestra mediante la existencia de una forma corta nativa de huCRlg biológicamente activa y un homólogo murino.

Las modificaciones covalentes de los polipéptidos CRlg de secuencia nativa y variantes se incluyen dentro del ámbito de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos de CRlg con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C- terminales del polipéptido CRlg. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para entrecruzar CRlg con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua, por ejemplo, para su uso en el método de purificación de anticuerpos anti-CRlg. Los agentes de entrecruzamiento normalmente usados, incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-acidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como el metil-3-[(p-acidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo para los restos correspondientes de glutamilo y aspártico, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo y treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos CRlg incluido dentro del ámbito de esta invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo de los polipéptidos. "Alterar el patrón de glucosilación nativo" pretende, para los fines del presente documento, significar la delección de una o más fracciones de hidratos de carbono que se encuentran en el CRlg de secuencia nativa y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no estén presentes en el CRlg de secuencia nativa, y/o la alteración de la relación y/o composición de los restos glucídicos unidos al sitio o sitios de glucosilación. Un sitio de glucosilación nativo predicho en el CRlg murino se encuentra en la posición 170 en la secuencia NGTG.

Generalmente, la glucosilación de los polipéptidos es glucosilación unida a N o unida a O. La glucosilación unida a N se refiere a la unión de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido

excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para que se produzca la unión enzimática de la fracción de hidrato de carbono con la cadena lateral de la asparagina. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden estar implicadas la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina en la glucosilación unida a O. El CRlg de secuencia nativa tiene una N-glucosilación significativa. La adición de sitios de glucosilación al polipéptido CRlg puede realizarse alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina, en la secuencia nativa de CRlg (para sitios de glucosilación unidos a O), o mediante la adición de una secuencia de reconocimiento para la glucosilación unida a N. La secuencia de aminoácidos de CRlg puede alterarse opcionalmente a través de cambios al nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido CRlg en bases preseleccionadas, de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de fracciones de hidrato de carbono en el polipéptido CRlg es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Dichos métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306 (1981).

La eliminación de fracciones de hidrato de carbono presentes en un polipéptido CRlg puede realizarse química o enzimáticamente o por sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que actúan como dianas para la glucosilación. Las técnicas de glucosilación química son conocidas en el campo y las describen, por ejemplo, Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de los fracciones de hidrato de carbono en los polipéptidos puede alcanzarse mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas, como describen Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de CRlg comprende unir el polipéptido CRlg con una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, por ejemplo, del modo expuesto en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

El CRlg de secuencia nativa y variantes de la presente invención también puede modificarse de modo que forme una molécula quimérica que comprenda CRlg, incluyendo fragmentos de CRlg, fusionada con otra secuencia polipeptídica o de aminoácidos heteróloga. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de CRlg con un polipéptido con etiqueta que proporciona un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epitópica generalmente se coloca en el extremo amino o carboxilo del polipéptido CRlg. La presencia de dichas formas de epítopos etiquetados del polipéptido CRlg puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido con etiqueta. Además, al proporcionar una etiqueta epitópica se permite que el polipéptido CRlg se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta y otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epitópica. En la técnica se conocen bien diversos polipéptidos con etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de polihistidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gli); el polipéptido con etiqueta HA (hemaglutinina) gripal y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glucoproteína D (gD) del virus del Herpes Simple y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos con etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epitópico KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; y un péptido epitópico de α -tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y la etiqueta peptídica de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 6393-6397 (1990)].

En otra realización, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido CRlg, o un fragmento del mismo, con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión puede ser en la región Fc de una molécula de IgG. Estos polipéptidos de fusión son moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina, y con frecuencia reciben el nombre de inmunoadhesinas. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta al sitio de reconocimiento y de unión al antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de una inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina es generalmente una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina de la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

En la técnica se conocen quimeras construidas a partir de una secuencia receptora unida a una secuencia apropiada de dominio constante de inmunoglobulina (inmunoadhesinas). Las inmunoadhesinas descritas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 84: 2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, Nature 337: 525-531 (1989); Trautnecker *et al.*, Nature, 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA, 9: 347-353 (1990); Byrn *et al.*, Nature, 344: 667-670 (1990)); L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson *et al.*, J. Cell. Biol., 110: 2221-2229 (1990); Watson *et al.*, Nature, 349: 164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*,

Cell, 61: 1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med., 173: 721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. 174: 561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell, 66: 1133-11144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539(1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol., 27: 2883-2886(1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med., 174: 1483-1489(1991)); receptores de NP (Bennett *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 23060-23067(1991)); y receptor alfa de IgE. (Ridgway *et al.*, J. Cell. Biol., 115:resum.1448 (1991)).

El diseño más simple y más sencillo de inmunoadhesina combina la región (o regiones) de unión de la proteína "adhesina" con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, cuando se preparan las quimeras de CRlg-inmunoglobulina de la presente invención, un ácido nucleico que codifica el polipéptido CRlg, o el dominio extracelular de un polipéptido CRlg, se fusionará en el extremo C con el ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo también son posibles fusiones N terminales.

Generalmente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado conservará al menos la bisagra y los dominios CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan en el extremo C de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente en posición N-terminal del CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

El sitio exacto en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios particulares y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de las quimeras CRlg-inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, las quimeras CRlg-inmunoglobulina se ensamblan como monómeros, o hetero- u homomultímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros, esencialmente como se ilustra en el documento WO 91/08298.

En una realización preferida, la secuencia de un polipéptido CRlg humano de secuencia nativa tal como, por ejemplo, huCRlg(largo) (SEC ID N°: 4) o huCRlg(corto) (SEC ID N°: 6), o una secuencia de dominio extracelular de CRlg (incluyendo el DEC de huCRlg(largo) y huCRlg(corto)) se fusiona con el extremo N de la parte C terminal de un anticuerpo (en particular el dominio Fc), que contiene las funciones efectoras de una inmunoglobulina, por ejemplo, inmunoglobulina G₁ (IgG 1). Es posible fusionar toda la región constante de cadena pesada con la secuencia de CRlg o con el dominio extracelular de CRlg. Sin embargo, más preferentemente, en la fusión se usa una secuencia que comienza en la región bisagra inmediatamente cadena arriba del sitio de escisión con papaína (que define químicamente la parte Fc de la IgG; resto 216, considerando el primer resto de la región constante de cadena pesada 114, o sitios análogos de otras inmunoglobulinas). En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de CRlg se fusiona con la región bisagra y CH2 y CH3, o con los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG3. El sitio exacto en el que se realiza hace la fusión no es crítico, y el sitio óptimo puede determinarse por experimentación rutinaria. En las Figuras 59-61 se ilustran estructuras de inmunoadhesina CRlg-Ig específicas.

En algunas realizaciones, las quimeras CRlg-inmunoglobulina se ensamblan como un multímero, y particularmente como homo-dímeros o -tetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existe la IgG, IgD, e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; la IgM generalmente existe como un pentámero de unidades básicas de cuatro cadenas que se mantienen unidas entre sí por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en suero en forma multimérica. En el caso del multímero, cada unidad de cuatro cadenas puede ser la misma o diferente.

Como alternativa, la secuencia de CRlg o del dominio extracelular de CRlg puede insertarse entre las secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera de la inmunoglobulina de modo que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, la secuencia de CRlg, se fusiona con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, bien entre la bisagra y el dominio CH2, o entre los dominios CH2 y CH3. Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol., 28: 1027-1037 (1991) han descrito construcciones similares.

Aunque en las inmunoadhesinas de la presente invención no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina, puede estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina bien asociada de manera covalente con un polipéptido de fusión CRlg-cadena pesada de inmunoglobulina, o directamente fusionada con el dominio extracelular de CRlg. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa generalmente junto con el ADN que codifica la proteína de fusión CRlg-cadena pesada de inmunoglobulina. Después de la secreción, el híbrido de cadena pesada y la cadena ligera se asociarán de manera covalente para proporcionar una estructura similar a una inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina unidos por enlaces disulfuro. Métodos adecuados para la preparación de dichas estructuras se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 expedida el 28 de marzo de 1989.

En las Figuras 59, 60 y 67-70 se muestran secuencias de nucleótidos que codifican determinadas proteínas de fusión CRlg-Ig de la invención. Como se muestra en las Figuras 67-70, por ejemplo, las proteínas de fusión pueden contener un enlazador entre las secuencias de CRlg y de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, una secuencia peptídica corta, por ejemplo, DKHTT. Además, en algunas construcciones, puede delecionarse la secuencia entre la región transmembrana (TM) de CRlg y la región (Fc) de la inmunoglobulina (mencionada en el presente documento como la secuencia "tallo"). La posición aminoacídica donde comienza el enlazador en las diversas construcciones de CRlg que se muestran en las Figuras 67-70 es la siguiente: huCRlg-largo-Fc + tallo: posición 267; huCRlg-largo-Fc - tallo: posición 233; huCRlg-corto-Fc + tallo: posición 173; huCRlg-corto-Fc - tallo: posición 140.

2. Preparación de polipéptidos CRlg de secuencia nativa y variantes

El ADN que codifica los polipéptidos CRlg de secuencia nativa puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada de tejido que se cree que posee el ARNm de CRlg y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de CRlg humano puede obtenerse convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada de tejido humano, como se describe en el Ejemplo 1. El gen que codifica CRlg también puede obtenerse de una biblioteca genómica o por síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas pueden explorarse con sondas (tales como anticuerpos contra CRlg u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. La exploración de genotecas o de ADNc con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos convencionales, como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo de aislar el gen que codifica CRlg es usar la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

El ejemplo 1 describe técnicas para explorar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben tener la suficiente longitud y ser suficientemente claras de modo que se minimicen los positivos falsos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de modo que puede detectarse después de la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está explorando. Los métodos de marcaje son muy conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores tales como ATP marcado con ³²P, biotilización o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y rigurosidad alta, se proporcionan en Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado.

Las secuencias identificadas en dichos métodos de exploración de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como el GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (bien a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa puede determinarse a mediante el alineamiento de secuencias usando programas informáticos tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, DNASTAR e INHERIT que emplean diversos algoritmos para medir la homología.

El ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica proteínas pueden obtenerse explorando bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas usando la secuencia de aminoácidos deducida que se divulga en el presente documento por primera vez, y, si fuera necesario, usando procedimientos convencionales de extensión con cebadores como se describe en Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado, para detectar precursores y productos intermedios de procesamiento de ARNm que no se hayan retrotranscrito en ADNc.

Las células hospedadoras se transfectan o se transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de CRlg y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el experto en la materia sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y en Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado.

El experto habitual en la técnica conoce bien métodos de transfección, por ejemplo, con CaPO₄ y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora que se use, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado, o la electroporación generalmente se usan para procariontes u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de determinadas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859, publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos Nº 4.399.216 se han descrito aspectos generales de las transformaciones en sistemas de células hospedadoras de mamíferos. Las transformaciones en levaduras se realizan generalmente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para las diversas técnicas de transformación de células de mamíferos, véase Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, levaduras, o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, de la familia *Enterobacteriaceae*, tal como *E. coli*. Diversas cepas *E. coli* están disponibles al público, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635).

Además de procariotas, microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores adecuados para la clonación o expresión de vectores que codifican CRlg. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior que es de uso común.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de CRlg glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen las células de ovario de hámster Chino (CHO) y COS. Los ejemplos más específicos incluyen células de riñón de mono CV1 transformadas con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón humano embrionario (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivos en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster Chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); y células tumorales de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula hospedadora apropiada se incluye en la experiencia de la técnica.

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica CRlg puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores se encuentran disponibles para el público. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasas de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales conocidas por el experto en la materia.

Los polipéptidos CRlg pueden producirse de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o esta puede ser una parte del ADN de CRlg que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II termoestable al calor. Para la secreción en levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levaduras, el líder del factor alfa (incluyendo los factores líder de "*Saccharomyces* y *Kluyveromyces*", el último descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362,179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, las secuencias señal de mamífero pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma o de una especie relacionada, así como en líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias se conocen bien para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2: es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o VBP) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y clonación generalmente contendrán un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metrotexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa en bacilos.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de CRIg, tales como la DHFR o la timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea la DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO con actividad DHFR deficiente, preparada y propagada como describen Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para el uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos de CRIg para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien promotores reconocidos por una variedad de posibles células hospedadoras. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281: 544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); EP 36,776], y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S. D.) unida operativamente al ADN que codifica CRIg.

Los ejemplos adecuados de secuencias promotoras para el uso en levaduras hospedadoras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de controlar la transcripción a través de las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Adicionalmente, en el documento EP 73.657 se describen vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levaduras.

La transcripción de CRIg a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como el Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, un virus de la hepatitis B y el Virus de Simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos CRIg por eucariotas superiores puede aumentarse insertando en el vector una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, normalmente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, generalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus del lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' en la secuencia codificante de CRIg, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión que se usan en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se encuentran normalmente disponibles a partir de las regiones 5', ocasionalmente 3', no traducidas, de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica CRIg.

Aún, otros métodos, vectores y células hospedadoras, adecuados para la adaptación a la síntesis de CRIg en cultivos de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979); y en los documentos EP 117.060; y EP 117.058.

La amplificación y/o expresión génica puede medirse directamente en una muestra, por ejemplo, por transferencia de Southern y de Northern convencional, para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Pro. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como

alternativa, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden marcarse y el ensayo puede realizarse cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex en la superficie, puede detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

De manera alternativa, la expresión génica puede medirse por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o cortes tisulares y ensayos de cultivos celulares o de fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos, útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de muestras de fluidos, pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido CRlg de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra la secuencia exógena fusionada con el ADN de CRlg y que codifica un epítipo específico de anticuerpo.

Las formas de CRlg pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si están unidas a la membrana, pueden liberarse de la membrana usando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de CRlg pueden desestabilizarse por diversos medios físicos y químicos, tales como por ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonidos, desorganización mecánica, o agentes de lisis celular.

Puede desearse purificar CRlg de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sefarosa para eliminar los contaminantes tales como IgG; y columnas de metales quelantes para unir formas epitópicas etiquetadas del polipéptido CRlg. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa (o etapas) de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y del CRlg particular producido.

3. Enfermedades diana

Los polipéptidos CRlg y las inmunoadhesinas CRlg-Ig, son particularmente útiles para la prevención y el tratamiento de afecciones oculares asociadas al complemento (todas las afecciones y enfermedades oculares en cuya patología interviene el complemento, incluyendo las rutas clásicas y alternativa, y en particular la ruta alternativa del complemento), tales como, por ejemplo, las enfermedades maculares degenerativas, tales como todas las fases de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), incluyendo las formas seca y húmeda (no exudativa y exudativa), neovascularización coroidal (NVC), uveítis, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con la isquemia, endoftalmitis, y otras enfermedades intraoculares neovasculares, tales como el edema macular diabético, la miopía patológica, la enfermedad de Hippel-Lindau, la histoplasmosis ocular, la Oclusión de la Vena Central de la Retina (OVCOR), la neovascularización corneal y la neovascularización retiniana. Un grupo preferido de afecciones oculares asociadas al complemento incluye, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), incluyendo DMRE no exudativa (seca o atrófica) y exudativa (húmeda), neovascularización coroidal (NVC), retinopatía diabética (RD) y endoftalmitis.

La DMRE es una degeneración de la mácula relacionada con la edad, que es la causa principal de la disfunción visual irreversible en individuos mayores de 60 años. Existen dos tipos de DMRE, la DMRE no exudativa (seca) y exudativa (húmeda). La forma seca, o no exudativa, implica cambios atróficos e hipertróficos en el epitelio pigmentario retiniano (EPR) por debajo de la retina central (mácula) así como depósitos (drusas) en el EPR. Los pacientes con DMRE no exudativa pueden progresar a la forma húmeda, o exudativa, de la DMRE, en cuyos vasos sanguíneos anómalos, denominados membranas neovasculares coroidales (MNVC), se desarrollan bajo la retina, rezuman fluido y sangre, y finalmente causan una cicatriz cegadora en forma de disco en y bajo la retina. La DMRE no exudativa, que habitualmente es precursora de la DMRE exudativa, es más común. La presentación de la DMRE no exudativa varía; pudiendo estar presentes drusas duras, drusas blandas, atrofia geográfica del EPR, y aglutinación pigmentaria. Los componentes del complemento se depositan en el EPR inicialmente en la DMRE y son los principales constituyentes de las drusas.

La presente invención concierne específicamente al tratamiento de la DMRE de alto riesgo, incluyendo la DMRE de categoría 3 y de categoría 4. La DMRE de categoría 3 se caracteriza por la ausencia de DMRE avanzada en los dos ojos, teniendo al menos un ojo una agudeza visual de 20/32 o mejor con al menos una drusa grande (por ejemplo de 125 µm), drusas de extensión intermedia (tal como se mide por el área de la drusa), o atrofia geográfica (AG) que no implica el centro de la mácula, o cualquier combinación de estas. La DMRE de categoría 3 (que aún se considera DMAR "seca") tiene un alto riesgo de conversión a neovascularización coroidal (NVC).

La DMRE de alto riesgo de categoría 4 (clasificada como DMAR "húmeda") se caracteriza por una agudeza visual de 20/32 o mejor y sin DMRE avanzada (AG que implica al centro de la mácula o características de neovascularización

coroidal) en el índice ocular. El otro ojo se caracteriza por DMRE avanzada, o agudeza visual menor de 20/32 atribuible a maculopatía por DMRE. Normalmente, si la DMRE de alto riesgo no se trata, rápidamente progresa a neovascularización coroidal (NVC), a una velocidad aproximadamente 10-30 veces mayor que la velocidad de progresión para la DMRE de categoría 1 o 2 (no de alto riesgo).

El CRlg y las inmunoadhesinas CRlg-Ig, encuentran utilidad particular en la prevención de la progresión de la DMRE (en particular, DMRE de categoría 3 o categoría 4) a NVC, y/o en la prevención del desarrollo/progresión de DMRE o NVC en el otro ojo no afectado o menos afectado. En este contexto, el término "prevención" se usa en el más amplio sentido para incluir, el bloqueo completo o parcial y la ralentización de la progresión de la enfermedad, así como el retraso de la aparición de las formas más graves de la enfermedad. Los pacientes con alto riesgo de desarrollar o progresar a DMRE de alto riesgo (categoría 4) o a NVC se benefician especialmente de este aspecto de la invención.

Se sabe que el polimorfismo en el factor H del complemento (FHC) está asociado con el riesgo de un individuo a desarrollar DMRE y/o NVC. Las mutaciones en el FHC pueden activar el complemento, que a su vez puede conducir a DMRE/NVC. Se ha notificado recientemente que el polimorfismo del factor H del complemento (FHC) representa el 50 % del riesgo atribuible de DMRE (Klein *et al.*, Science 308: 385-9 (2005)). Se ha descubierto un haplotipo común en el FHC (HFI/FHC) que predispone a los individuos a la degeneración macular relacionada con la edad (Hageman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 102(2): 7227-7232 (2005)). La DMRE se ha segregado como un rasgo autosómico dominante, mapeando el locus de la enfermedad en el cromosoma 1q25-q31, entre los marcadores DIS466 y D1S413, con una puntuación LOD máxima de aproximadamente 3,20 (Klein *et al.*, Arch Ophthalmol. 116(8): 1082-9(1998); Majewski *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 73(3): 540-50 (2003); Seddon *et al.*, Am J. Hum. Genet. 73(4): 780-90 (2003); Weeks *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 132(5): 682-92 (2001); Iyengar *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 74(1): 20-39 (2004)); en el cromosoma 2q3/2q32, entre los marcadores D12S1391 y D2S1384, con una puntuación LOD máxima de 2,32/2,03 (Seddon *et al.*, anteriormente mencionado); en el cromosoma 3p13, entre los marcadores D12S1300 y D12S1763, con una puntuación LOD máxima de 2,19 (Majewski *et al.*, anteriormente mencionado; Schick *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 72(6): 1412-24 (2003)); en el cromosoma 6q14, entre los marcadores D6S1056 y DS249, con una puntuación LOD máxima de 3,59/3,17 (Kniazeva *et al.*, Am. J. Ophthalmol. 130(2): 197-202 (2000)); en el cromosoma 9q33, en el marcador D9S934, con una puntuación LOD máxima de 2,06 (Mejwski *et al.*, anteriormente mencionado); en el cromosoma 10q26, en el marcador D10S1230, con una puntuación LOD máxima de 3,06 (Majewski *et al.*, anteriormente mencionado; Iyengar *et al.*, anteriormente mencionado; Kenealy *et al.*, Mol. Vis. 10: 57-61 (2004); en el cromosoma 17q25, en el marcador D17S928, con una puntuación LOD máxima de 3,16 (Weeks *et al.*, anteriormente mencionado); y en el cromosoma 22q12, en el marcador D22S1045, con una puntuación LOD máxima de 2,0 (Seddon *et al.*, anteriormente mencionado). Por consiguiente, la exploración genética es una parte importante para identificar pacientes que son particularmente buenos candidatos para el tratamiento preventivo, incluyen la prevención de la progresión de la enfermedad a una forma más grave, tal como de DMRE a NVC.

Además, a la vista de las contundentes pruebas de una relación de la activación del complemento y la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), la presente invención proporciona un nuevo método para la prevención y el tratamiento de la NVC y la DMRE mediante la inhibición del complemento, en particular, mediante la inhibición de la ruta alternativa.

4. Métodos de tratamiento

Para la prevención, el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad ocular asociada al complemento (inmunorelacionada), la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de la enfermedad a tratar, tal como se define anteriormente, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, del historial clínico del paciente, de la respuesta al compuesto y del criterio del médico tratante. El compuesto se administra adecuadamente al paciente una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, es deseable determinar la curva de respuesta a la dosis y ensayar la composición farmacéutica de la invención, primero *in vitro*, y después en modelos animales útiles antes de realizar su ensayo en seres humanos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, la dosificación de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 - 20 mg/kg) de polipéptido, es una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, por ejemplo, bien mediante una o más administraciones distintas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas. Sin embargo, pueden utilizarse otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección ocular, los compuestos de la invención se administran generalmente mediante inyección ocular, intraocular y/o intravítrea. También pueden usarse otros métodos de administración, que incluyen, pero sin limitación, administración tópica, parenteral, subcutánea,

intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal e intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea.

Para la administración ocular, intraocular o intravítrea las composiciones pueden prepararse mediante métodos y usos de ingredientes conocidos en la técnica. Un requisito principal para el tratamiento eficaz es la adecuada penetración a través del ojo. A diferencia de las enfermedades de la parte anterior del ojo, donde los fármacos pueden administrarse por vía tópica, las enfermedades de la retina requieren una estrategia más específica de sitio. Las gotas y pomadas oculares raramente penetran en la parte posterior del ojo y la barrera hemato-ocular obstaculiza la penetración de los fármacos administrados por vía sistémica en el tejido ocular. Por consiguiente, normalmente el método de elección para el suministro de fármacos para tratar enfermedades de la retina, tales como la DMRE o la NVC, es la inyección intravítrea directa. Las inyecciones intravítreas se repiten normalmente a intervalos que dependen de la afección del paciente y de las propiedades y semivida del fármaco suministrado. Para la penetración intraocular (por ejemplo, intravítrea), normalmente se prefieren moléculas de tamaño más pequeño. En el caso de CRlg, todas las formas, incluyendo el DEC de las formas corta y larga de huCRlg, sus fusiones con Ig (Fc), las formas larga y corta de huCRlg de longitud completa, y todas sus fusiones con Ig (Fc) son adecuadas para el suministro intraocular (incluyendo el intravítreo).

La eficacia del tratamiento de las afecciones oculares asociadas al complemento, tales como la DMRE o la NVC, puede medirse mediante diversos criterios de valoración que se usan comúnmente en la evaluación de las enfermedades intraoculares. Por ejemplo, puede evaluarse la pérdida de visión. La pérdida de visión puede evaluarse, por ejemplo, aunque sin limitación, midiendo el cambio medio en la mejor agudeza visual corregida (MAVC) desde el inicio en un momento deseado (por ejemplo, en el que la MCAV se basa en la Gráfica de Agudeza Visual del Estudio del Tratamiento Precoz de la Retinopatía Diabética (ETPRD) y en la evaluación de una distancia de ensayo de 4 metros), midiendo la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras en la agudeza visual en un momento deseado en comparación con el dato inicial, midiendo la proporción de sujetos que ganan más o igual a 15 letras en la agudeza visual en un momento deseado en comparación con el dato inicial, midiendo la proporción de sujetos con una agudeza visual de Snellen equivalente a 20/2000 o peor en un momento deseado, midiendo el Cuestionario NEI sobre Funcionamiento Visual, midiendo el tamaño de la NVC y la cantidad de pérdida de NVC en un momento deseado, por ejemplo, mediante angiografía con fluoresceína, etc. Pueden hacerse evaluaciones oculares, por ejemplo, que incluyan, pero sin limitación, por ejemplo, la realización de un examen ocular, la medición de la presión intraocular, la evaluación de la agudeza visual, la medición de la presión con lámpara de hendidura, la evaluación de la inflamación intraocular, etc.

Las composiciones del presente documento pueden combinarse con una o más modalidades de tratamiento adicionales para la prevención o el tratamiento de la enfermedad o afección a la que se dirigen. Por lo tanto, por ejemplo, si el objetivo es la prevención o el tratamiento de afecciones oculares asociadas al complemento, la administración de CRlg (incluyendo todas las formas y sus regiones EC y/o fusiones con Ig) puede combinarse con o complementar la administración del anticuerpo anti-VEGF-A ranibizumab (Lucentis™, Genentech, Inc.), que está en desarrollo clínico para el tratamiento de la DMRE. En un ensayo clínico en Fase III que ha concluido recientemente, además de reunir el criterio de valoración de eficacia del estudio de mantener la visión en pacientes con DMRE húmeda, el 25 por ciento (59/238) de los pacientes tratados con 0,3 mg de Lucentis y el 34 por ciento (81/240) de los tratados con 0,5 mg de Lucentis™ mejoraron la visión con una ganancia de 15 letras o más en comparación con aproximadamente el 5 por ciento (11/238) de los pacientes en el grupo control, tal como se mide con la Gráfica de Agudeza Visual del Estudio del Tratamiento Precoz de la Retinopatía Diabética (ETPRD). Aproximadamente el 40 por ciento (188/478) de los pacientes tratados con Lucentis™ alcanzaron una puntuación de la agudeza visual de 20/40 o mejor a los 12 meses en comparación con el 11 por ciento (26/238) en el grupo control. A los 12 meses, los pacientes tratados con Lucentis™ ganaron una media de siete letras en la agudeza visual en comparación con cuando se incorporaron al estudio, mientras que los pacientes del grupo control perdieron una media de 10,5 letras.

5. *Ensayos de exploración y modelos animales*

El CRlg y las fusiones de CRlg y del DEC de CRlg con Ig, pueden evaluarse en diversos ensayos basados en células y en modelos animales de enfermedades o trastornos asociados al complemento.

Un modelo animal de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) consiste en ratones con una mutación nula en los genes Ccl-2 o Ccr-2. Estos ratones desarrollan características fundamentales de la DMRE, incluyendo la acumulación de lipofusina en drusas y debajo del epitelio pigmentado retiniano (EPR), la atrofia de fotorreceptores y la neovascularización coroidal (NVC). Estas características se desarrollan por encima de los 6 meses de edad. El CRlg y los agonistas de CRlg pueden someterse a ensayo con respecto a la formación de drusas, atrofia de fotorreceptores y neovascularización coroidal.

La NVC, puede ensayarse en diversos modelos de neovascularización coroidal inducida por láser. Por ejemplo, la NVC puede inducirse en ratas y en monos *Cynomolgus* mediante fotocoagulación con láser intensa, lo que da como resultado la neovascularización coroidal. El progreso y el tratamiento de esta afección pueden evaluarse, por ejemplo, mediante angiografía con fluoresceína, mediante evaluación histopatológica e inmunohistoquímica y mediante ensayos farmacocinéticos, hemolíticos, de exploración con anticuerpos y de activación del complemento

de suero extraído de los animales antes y después del tratamiento, en diferentes intervalos de tiempo. La eficacia de la administración preventiva puede controlarse mediante métodos similares, incluyendo control de filtración vascular mediante angiografía con fluoresceína, inhibición de la deposición de complemento en el sitio de la quemadura por láser, examen ocular, fotografía ocular, extracción de humor vítreo y tejido retinal, y similares. Más adelante se proporcionan detalles adicionales en los ejemplos.

6. *Composiciones farmacéuticas*

Las moléculas activas de la invención, pueden administrarse para el tratamiento de afecciones oculares asociadas al complemento en forma de composiciones farmacéuticas.

Las formulaciones terapéuticas de la molécula activa, como se define en las reivindicaciones, se preparan para su conservación mezclando la molécula activa que tiene el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o estabilizantes opcionales, farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes o estabilizantes adecuados no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el polipéptido a las células.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente compuestos que tienen actividades complementarias que no se afectan de modo adverso entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, un agente inhibidor de citocinas o del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin al que se destinan.

Las moléculas activas también pueden incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto puede llevarse a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o alcohol poli(vinílico)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros, tales como acetato de etilenvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante mucho tiempo, estos pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de relación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, puede alcanzarse la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Para la administración intraocular, generalmente se usan formulaciones para inyección, que se proporcionan normalmente con seis semanas de diferencia. Antes de cada inyección se anestesia el ojo.

Sin embargo, también es posible usar implantes con formulaciones de liberación sostenida de CRlg o una fusión de CRlg-Ig o del DEC de CRlg-Ig, para liberación intravítrea.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y de ningún modo no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Salvo que se indique otra cosa, los reactivos disponibles en el comercio que se mencionan en los ejemplos, se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, mediante números de referencia de la ATCC, es la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Ejemplo 1

Aislamiento de clones de ADNc que codifican el CRlg humano (PR0362)

Se usaron las secuencias del dominio extracelular (DEC) (incluyendo la señal de secreción, si hubiese alguna) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos de proteínas públicas Swiss-Prot para investigar bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST, Expressed Sequence Tags). Las bases de datos EST incluyeron bases de datos EST públicas (por ejemplo GenBank) y una base de datos de ADN EST patentada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó usando el programa informático BLAST o BLAST-2 (por ejemplo, Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) como una comparación de las secuencias de DEC de la proteína con una traducción de 6 fases de la secuencia EST. Aquellas comparaciones que dieron como resultado en el BLAST una puntuación de 70 (o en algunos casos de 90) o mayor que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phi1 Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Una secuencia de ADN consenso se ensambló con respecto a otras secuencias EST usando el programa *phrap*. Esta secuencia consenso se denominó ADN42257 (SEC ID N°: 9) (véase la Figura 32) en el presente documento. Basándose en la secuencia consenso ADN42257 (SEC ID N°: 9) mostrada en la Figura 32, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR una biblioteca de ADNc que contenían la secuencia de interés, y 2) para usarlos como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para CRlg. Los cebadores directo e inverso de la PCT generalmente varían de 20 a 30 nucleótidos y a menudo se diseñan para dar un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de las sondas generalmente tienen una longitud de 40-55 pb. En algunos casos, se sintetizaron oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia consenso era mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Con el fin de explorar diversas bibliotecas para un clon de longitud completa, las bibliotecas de ADN se exploraron mediante amplificación por PCR, según Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, con el par de cebadores de PCR. Después, se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaba el gen de interés usando el oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebadores.

Se sintetizaron los pares de cebadores (directo e inverso):

cebador de PCR directo 1 (42257.d1)	5'-TATCCCTCCAATTGAGCACCTGG-3' (SEC ID N°: 10)
cebador de PCR directo 2 (42257.d2)	5'-GTCGGAAGACATCCCAACAAG-3' (SEC ID N°: 11)
cebador de PCR inverso 1 (42257.i1)	5'-CTTCACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (SEC ID N°: 12)
cebador de PCR inverso 2 (42257.i2)	5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (SEC ID N°: 13)

Adicionalmente, se construyó una sonda de hibridación oligonucleotídica sintética a partir de la secuencia consenso ADN42257 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

Sonda de hibridación (42257.s1)
5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3' (SEC ID N°: 14).

Con el fin de explorar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, el ADN de las bibliotecas se exploró mediante amplificación por PCR con los pares cebadores de PCR anteriormente identificados. Después, se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaba el gen de CRlg usando el oligonucleótido sonda y uno de los cebadores de PCR.

Para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló ARN de tejido cerebral fetal humano (LIB 153). Las bibliotecas de ADNc usadas para aislar los clones de ADNc se construyeron por métodos convencionales usando reactivos disponibles en el comercio, tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio NotI, se unió por extremo romo a adaptadores con hemiquinasa de Sall, se escindieron con NotI, se separaron por tamaño apropiadamente mediante electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio de SfiI; véase, Homes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos de XhoI y NotI.

La secuenciación de ADN de los clones aislados tal como se describe produjo la secuencia de ADN para un polipéptido CRlg aislado (denominado en el presente documento UNQ317 (ADN45416-1251) (SEC ID N°: 1).

La secuencia completa de nucleótidos de UNQ317 (ADN45416-1251) se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 1). El clon UNQ367 (ADN45416-1251) (SEC ID N°: 1) contiene una sola fase de lectura abierta con un sitio aparente de inicio de la traducción en las posiciones nucleotídicas 1082-1084 (Figura 1, SEC ID N°: 1). El precursor polipeptídico predicho tiene una longitud de 321 aminoácidos (Figura 1, SEC ID N°: 2). La proteína CRlg que se muestra en la Figura 1 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente el 35.544 daltons y un pI de aproximadamente 8,51. El análisis del polipéptido CRlg de 321 aminoácidos, como se muestra en la Figura 1 (SEC ID N°: 2), confirma la presencia de un sitio de unión a glucosaminoglicano en aproximadamente el aminoácido 149 a aproximadamente el aminoácido 152 y un dominio transmembrana de aproximadamente el aminoácido 276 a aproximadamente el aminoácido 306. El clon UNQ317 (ADN45416-1251) se ha depositado en la ATCC con el N° de depósito: 209620.

Similar a los miembros de la familia JAM, CRlg (PRO362), más recientemente mencionado como CRlg, es una molécula transmembrana de tipo 1 y un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. El dominio extracelular de la forma larga del CRlg humano (huCRlg(L)) codifica ambos dominios terminales de IgG de tipo V y de tipo C2 (Smith y Xue, J. Mol. Biol. 274: 530-545 (1997)), mientras que la forma corta (huCRlg(C)) solo codifica un único tipo V de la Ig, pareciéndose al CRlg murino (muCRlg) (Figura 50A). El dominio citoplasmático C terminal de CRlg humano y murino contiene motivos de internalización consenso AP-2 (YARL y DSQALI, respectivamente Bonafacino y Traub Ann Rev Biochem 72 página 395 (2003)). Los HuCRlg y muCRlg comparten el 67 % de la homología total de secuencia residendo el 83 % de la homología en el dominio IgV. Entre los miembros de la familia JAM, huCRlg es el más estrechamente relacionado con JAM-A. La similitud de secuencia se confina a un tramo de restos conservados que forman el pliegue del dominio de Ig (Figura 50A). Tanto el CRlg humano como el murino se localizan en el cromosoma X en la posición Xq12 y tienen una posición sinténica en el cromosoma flanqueada por hefastina y moesina.

Ejemplo 2

Producción y purificación de proteínas

Los dominios extracelulares de CRlg hu (humano) y mu (murino) se clonaron en un vector de expresión pRK5 modificado que codifica la región Fc de la IgG1 humana o murina cadena abajo de la secuencia de CRlg. La parte Fc de la IgG1 de ratón que contiene una mutación doble (D265A, N297A) que impide la unión del receptor de Fc (Gong *et al*, J. Immunol. 174: 817-826 (2005)) se usó para controlar la regulación del receptor de Fc. Como controles se usaron la proteína de fusión Fc IREM-1 humana y CLM-1 de ratón o un anticuerpo anti-IgG gp120 murino. El CRlg etiquetado con LFH se preparó fusionando el DEC de CRlg con una cremallera de leucina de levadura, un Flag e histidina (6) en el extremo C. Las proteínas se sobreexpresaron en células CHO mediante transfecciones transitorias. Las células crecieron en biorreactores completamente automatizados usando medios basados en medio de Eagle modificado con F-12/Dulbecco complementado con suero con contenido Ultra-Bajo de IgG (Invitrogen) y Primatone HS (Sigma). El cultivo se mantuvo durante de 7-12 días hasta que las proteínas de fusión Fc recogidas se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A y posterior filtración en gel Sephacryl S-300. La proteína de fusión LFH se purificó sobre una columna de níquel. La proteína CRlg-DEC humana se purificó por afinidad sobre una columna de Gliceril-CPG (173700404) de Millipore a la cual se absorbió el anticuerpo monoclonal 3C9. La proteína se eluyó a un pH de 3,0 y se generaron los CRlg hu y mu-HIS por clonación del DEC de CRlg en un vector de expresión de baculovirus que contenía histidinas (6) en el extremo C. El ADN plasmídico se transfeció en células Sf9, el sobrenadante se usó para infectar células H5 y las proteínas se purificaron sobre una columna de níquel. Las identidades de todas las proteínas purificadas se verificaron mediante análisis de la secuencia del extremo N y la concentración de lipopolisacárido fue <5 Eu/mg para todas las preparaciones de CRlg humano y murino.

Ejemplo 3

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se generaron inmunizando conejos de Nueva Zelanda con 200 µg de huCRlg(L)-His en adyuvante completo de Freud seguido de un refuerzo 6 semanas después de la primera inmunización. Los anticuerpos monoclonales contra muCRlg y huCRlg se generaron inmunizando ratas Wistar y ratones Balb/c con 50 µg de proteína de fusión CRlg etiquetada con histidina mediante inyección en la almohadilla plantar. Los clones se seleccionaron basándose en su reactividad con CRlg-DEC humano y murino mediante ELISA, FACS, transferencia de Western e inmunohistoquímica. A menos que se indique lo contrario, los anticuerpos obtenidos se usaron en los ensayos posteriores.

Ejemplo 4

Infiltrados de células inflamatorias en piel de cobaya

El siguiente ejemplo muestra que huCRlg (PRO362) es proinflamatorio ya que estimula infiltrados de células inflamatorias (es decir, neutrófilas, eosinófilas, monocíticas, linfocíticas) en piel de cobayas. El ensayo que se describe en el presente documento controla la capacidad de esta proteína para inducir un infiltrado de células inflamatorias en la piel de una cobaya. Los compuestos que estimulan la infiltración inflamatoria son útiles terapéuticamente cuando la potenciación de una respuesta inflamatoria es beneficiosa. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son útiles terapéuticamente cuando la supresión de una respuesta inflamatoria es beneficiosa. Un agente terapéutico puede tener forma, por ejemplo, de anticuerpos quiméricos murinos-humanos, humanizados o humanos contra CRlg, moléculas pequeñas, péptidos, etc. que imitan la actividad biológica de CRlg, proteínas de fusión CRlg-Ig, región extracelular de CRlg, y similares.

Se anestesió a cobayas lampiñas (Charles River Labs) que pesaban 350 gramos o más con ketamina (75-80 mg/kg de peso corporal) y xilacina (5 mg/kg de peso corporal) por vía intramuscular. Las muestras de las proteínas huCRlg y control se inyectaron por vía intradérmica en el dorso de cada animal a un volumen de 100 µl por sitio de inyección. Hubo aproximadamente 16-24 sitios de inyección por animal. Se inyectó por vía intracardiaca 1 ml de colorante azul Evans (al 1 % en solución salina fisiológica tamponada). Los animales se sometieron a eutanasia 6 horas después y se realizó una biopsia de cada sitio de inyección cutánea y se fijó en formalina. Las pieles se prepararon para la evaluación histopatológica. Cada sitio se evaluó para determinar la infiltración de células inflamatorias en la piel. Los sitios con células inflamatorias visibles se puntuaron como positivos. Las muestras que inducían un infiltrado de células inflamatorias se puntuaron como sustancias proinflamatorias. En este ensayo el CRlg dio positivo, lo que indica actividad antiinflamatoria.

Ejemplo 5

Expresión del ARNm y del polipéptido CRlg (PRO362)

A. Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica

La expresión del ARNm de CRlg se evaluó por hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y RT-PCR en diversos tipos de tejidos.

Para la hibridación *in situ*, los tejidos se fijaron (formalina al 4 %), se incluyeron en parafina, se seccionaron (3-5 µm de espesor), se desparafinaron, se desproteinizaron (20 µg/ml) con proteinasa K (15 minutos a 37 °C), y se procesaron para la hibridación *in situ*. Las sondas de los polipéptidos de la invención se produjeron mediante PCR. Los cebadores incluyeron sitios de inicio de la ARN polimerasa de T7 o T3 para permitir la transcripción *in vitro* de sondas en sentido o antisentido a partir de los productos amplificados. Las sondas en sentido o antisentido marcadas con ³³P-UTP se hibridaron durante la noche (55 °C), se lavaron (SSC 0,1 X durante 2 horas a 55 °C), se sumergieron en emulsión de rastreo nuclear NBT2 (Eastman Kodak, Rochester, NY), se expusieron (4-6 semanas a 4 °C), y se desarrollaron y tiñeron con colorante con hematoxilina y eosina de contraste. Se muestran normalmente imágenes pares de campo brillante y oscuro representativas.

La tinción inmunohistoquímica se realizó en secciones congeladas de 5 mm de espesor usando un Autocolorante de DAKO. La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó con la Solución de Bloqueo de Kirkegaard y Perry (1:10,4 minutos a 20 °C). Se usó SNC al 10 % en TBS/Tween 20 al 0,05 % (DAKO) para dilución y bloqueo. Se usó AcM anti-CRlg 4F722.2 (anti-PRO362) o IgG de ratón a 0,13 mg/ml. Se usó IgG de cabra anti-ratón biotinilada (Vector Labs), Burlingame, CA) a 1:200 y se detectó con el Kit Convencional ABC Elite de Vector Labs (Vector Labs, Burlingame, CA). Los portaobjetos se revelaron usando diaminobencidina potenciada con metal de Pierce (Pierce Chemicals, Rockford, IL). La inmunohistoquímica doble para la expresión de CRlg (PRO362) y CD68 se realizó en secciones congeladas para demostrar la localización de la expresión de CRlg en macrófagos. Se utilizaron el AcM anti-CRlg 4F7.22.2 y el AcM anti-CD68 KP-1 de (DAKO) y se detectaron con los marcadores ficoeritrina y FITC, respectivamente.

La expresión se examinó en una amplia variedad de tipos de tejidos y células de seres humanos y de otros mamíferos.

a. Tejido normal

Los tejidos adultos normales humanos que se examinaron incluyeron amígdalas, ganglios linfáticos, bazo, riñón, vejiga urinaria, pulmón, corazón, aorta, arteria coronaria, hígado, vesícula biliar, próstata, estómago, intestino delgado, colon, páncreas, glándula tiroidea, piel, glándula adrenal, placenta, útero, ovario, testículos, retina y cerebro (cerebelo, tronco cerebral, corteza cerebral). También se ensayaron tejidos fetales humanos normales que incluyeron cerebro, bazo, intestino y tiroides de E12-E16 semanas. Además, se investigó la expresión en hígado murino.

b. Tejido inflamado

Los tejidos inflamados examinados por hibridación *in situ* incluyeron tejidos con enfermedad inflamatoria crónica tales como pulmones con asma crónica, bronconeumonía crónica, bronquitis crónica/enfermedad pulmonar obstructiva crónica, riñones con nefritis intersticial linfocítica crónica, e hígados con inflamación crónica y cirrosis debida a infección crónica por hepatitis C, hepatitis autoinmunitaria o cirrosis alcohólica.

c. Neoplasmas primarios

Los neoplasmas humanos primarios que se examinaron por hibridación *in situ* para la expresión de PRO362 incluyeron carcinoma mamario, carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma prostático, y adenocarcinoma colónico.

2. Resultados

Se descubrió que CRlg (PRO362) se expresaba en secciones congeladas de hígado de ratón (Figura 6), en secciones congeladas de hígado humano (Figura 7) y en diversas células similares a macrófagos tisulares, incluyendo macrófagos del colon (Figura 8A), en células de Kupffer (Figura 8B), en macrófagos adrenales (Figura 8C), en células de Hofbauer (Figura 8D), en células sinoviales (Figura 9), en macrófagos alveolares, en macrófagos residentes en la lámina propia intestinal y en macrófagos intersticiales en muchos tejidos. CRlg también se expresaba significativamente en la microglia cerebral (Figura 10). La expresión de CRlg aumentó significativamente en estos tejidos cuando se activó debido a la presencia de neoplasia o enfermedad inflamatoria, incluyendo artritis reumatoide (Figura 9), enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis crónica (Figura 12), neumonía, asma crónica (Figura 11), glioma y bronquitis.

Para examinar adicionalmente la expresión de CRlg, se realizó tinción inmunohistoquímica en diversos tipos de tejidos. La tinción inmunohistoquímica doble para CRlg y CD68 se realizó en macrófagos tisulares, incluyendo macrófagos de la glándula adrenal, células de Kupffer hepáticas, células de la microglia cerebral, y células de Hofbauer placentarias para determinar si CRlg y CD68 se expresan en los mismos tejidos.

Se descubrió que CRlg se coexpresaba junto con CD68 en macrófagos de la glándula adrenal (Figura 13), en células de Kupffer hepáticas (Figura 14), en células de la microglia cerebral (Figura 15) y en células de Hofbauer placentarias (Figura 16).

Ejemplo 6

Implicación de CRlg (PRO362) en inflamación crónica

El nuevo receptor asociado con macrófagos con homología con el antígeno A33 y JAM1 se clonó como se describe en el Ejemplo 1 y más adelante, y se identificó como un polipéptido asociado a macrófagos miembro de la superfamilia de Ig de un solo dominio transmembrana (CRlg o PRO362).

CRlg se expresa como dos variantes de corte y empalme. Una variante es un polipéptido de 399 aminoácidos que contiene un dominio N terminal similar a IgV y un dominio C terminal similar a IgC2, que se denomina huCRlg o huCRlg-largo (SEC ID N°: 4). La forma cortada y empalmada, que tiene 355 aminoácidos de longitud, que carece del dominio C terminal, se denomina huCRlg-corto (SEC ID N°: 6). Ambos receptores tienen un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que contiene restos de tirosina que están fosforilados de manera constitutiva en macrófagos *in vitro*.

El presente estudio demuestra que CRlg se expresa selectivamente en un subconjunto de macrófagos residentes en tejidos y que está asociado con inflamación crónica.

Materiales y métodos

Células

La sangre se obtuvo por punción venosa de voluntarios adultos sanos después de dar su consentimiento tras recibir la información oportuna y se separó usando Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. Las CMSP se obtuvieron de la interfase, se lavaron en PBS frío, y se lisaron con NaCl al 0,2 % durante 30 segundos y se neutralizaron con NaCl al 1,6 %. Se contaron las células y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Para aislar subconjuntos de sangre periférica, se usaron kits de MACS intactos (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La diferenciación a un fenotipo de macrófago se indujo cultivando monocitos CD14⁺ durante hasta 2 semanas en medio HG-DMEM que contenía suero humano autólogo al 10 % (v/v), suero bovino fetal al 20 % y 1 glutamina 10 mM, penicilina y estreptomicina. El medio se reemplazó el día 5. Para el análisis por citometría de flujo, las células se disociaron de la placa de cultivo usando solución de disociación celular enfriada en hielo (Sigma). Los lisados para los análisis de transferencia de Western se prepararon añadiendo 0,5 ml de tampón de lisis directamente a los pocillos. Los lisados se mezclaron con el tampón

de la muestra que contenía SDS y beta-mercaptoetanol, se procesaron en un gel de Tris-Glicina y se transflectaron a una membrana de nitrocelulosa. La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul de tripano.

Citometría de flujo

Para su uso en el análisis de citometría de flujo las células se bloquearon durante 30 minutos a 4 °C con PBS que contenía suero bovino fetal al 2 % y 5 µg/ml de IgG humana (Calbiochem, San Diego, CA). A continuación, las células se incubaron con 3C9, un anticuerpo monoclonal anti-CRlg (anti-PRO362). Después de lavar en PBS, las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE) contra CD11b, CD14, CD163, CD15, CD68 que se obtuvieron de Pharmingen.

Estudios de adhesión célula - célula

Un vector de expresión pRK, que contenía CRlg de longitud completa, se expresó de modo estable en una línea de células T Jurkat humana usando selección con neomicina y clasificación con autoclón, como se describe en cualquier otra parte. Las células se precargaron con el colorante fluorescente BCECF (Molecular Probes, Oregón) y se añadieron a una placa de 96 pocillos Maxisorb (CORNING™) recubierta con una monocapa de células endoteliales humanas de la vena del cordón umbilical (HUVEC) tratadas con o sin TNFα 10 ng/ml. Las células se mezclaron suavemente cargando los pocillos con tampón de incubación (HBSS que contenía CaCl 10 mM, magnesio 10 mM y NaCl 1,5 mM) seguido de inversión de la placa en un trozo de papel de transferencia. Después de 3 lavados, se hizo un recuento de la fluorescencia en un fluoroespectrómetro. La lectura de la fluorescencia es representativa del número de células que permanecen adheridas a las células HUVEC.

Análisis de transferencia de Northern

Se exploraron transferencias de Northern (CLONTECH) de tejidos múltiples con una sonda de ADNc de CRlg de longitud completa cebado aleatoriamente marcada con ³²P usando el kit de Ambion de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las transferencias se expusieron a una exploración de formación de imágenes de fósforo durante 4 horas a 22 °C. Las transferencias se separaron y se volvieron a explorar con una sonda comercialmente disponible para β actina humana o de ratón (Clontech) para evaluar la carga y la cantidad de ARN en cada carril, y se analizaron con un PhosphorImager Storm® (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Análisis por RT-PCR en tiempo real

Para el análisis por PCR cuantitativa (TAQMAN™), se recomendó ARNm total de tejidos humanos o de células primarias (100 ng) (PerkinElmer Life Sciences) con cebadores basados en la secuencia codificante de CRlg.

Producción de proteína de fusión con Fc e His

Se clonó el CRlg humano en el vector de expresión de baculovirus pHF (Pharmingen). La proteína de fusión CRlg - etiquetada con HIS consistía en el dominio extracelular de CRlg fusionado a 8 histidinas. La proteína de fusión etiquetada con His se purificó del sobrenadante de células de insecto infectadas con baculovirus cultivadas en suspensión usando resina de afinidad a níquel.

Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales

Para los presentes experimentos, se inmunizaron hembras BALBc y recibieron un refuerzo con 10 µg de CRlg-His8 por medio de inyecciones en la almohadilla plantar, como previamente describen Ghilardi *et al*, J. Biol. Chem. 277: 16831-16836 (2002). Se exploraron clones sencillos contra His-CRlg mediante ELISA. Los clones seleccionados se ensayaron contra miembros de la familia JAM y la región Fc de la IgG humana. Los clones se titularon hasta densidades unicelulares y se volvieron a explorar. Se descubrió que el clon 3C9 (IgG1) reaccionada selectivamente contra CRlg. Los clones se usaron para la generación de ascitis y se purificaron sobre proteína G (Amersham Pharmacia Biotech); la concentración de las proteínas se determinó usando el reactivo BCA de Pierce (Pierce, Rockford, IL).

Los anticuerpos policlonales se generaron inyectando 150 µg de CRlg-His en Conejos de Nueva Zelanda. Los títulos séricos se determinaron mediante ELISA. El suero se recogió en el pico de los niveles circulantes de IgG y se purificó sobre una columna de proteína A.

Hibridación in situ

Se diseñaron cebadores de PCR (superior 5'-TCTCTGTCTCCAAGCCCACAG (SEC ID N°: 18), e inferior, 5'-CTTTGAG-GAGTCTTTGACC (SEC ID N°: 19) para amplificar un fragmento de 700 pb de huJAM4. Los cebadores incluyeron los sitios de inicio de la ARN polimerasa de T7 o T3 para permitir la transcripción *in vitro* de sondas en sentido y antisentido, respectivamente, de los productos amplificados. Los tejidos humanos normales incluyeron amígdalas, ganglios linfáticos, bazo, riñón, pulmón y corazón. Los tejidos con enfermedad inflamatoria crónica

incluyeron pulmón con asma crónica, bronquitis crónica, hígados con inflamación crónica y cirrosis debida a infección crónica por hepatitis C. Los tejidos se fijaron en formalina al 4 %, se incluyeron en parafina, se seccionaron (3-5 µm de espesor), se desparafinaron, se desproteinizaron con 20 µg/ml de proteinasa K (15 min a 37 °C) y se procesaron para la hibridación *in situ*, como se describe en cualquier otra parte.

Immunohistoquímica

El hígado humano se obtuvo en Arda Corporation, Lexington, MA. La tinción inmunohistoquímica se realizó en secciones hepáticas congeladas de 5-6 µm de espesor usando un autocolorante de DAKO. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con solución de bloqueo de Kirkegaard y Perry (1:10, 4 min 20 °C). Se usó suero normal de cabra (SNC) al 10 % en TBS/Tween-20 al 0,05 % para la dilución y el bloqueo. Se usó el AcM 3C9 a 1 µg/ml. Los portaobjetos se revelaron usando diaminobencidina potenciada con metal (Pierce Chemicals).

Para la tinción de las secciones por inmunofluorescencia, estas se bloquearon con PBS/SNC al 10 % y se incubaron con el AcM 3C9 durante 1 h a 20 °C. Como agente de detección se usó un anticuerpo secundario anti-conejo de ratón marcado con FITC conjugado con FITS. Para el procedimiento de doble tinción, se tiñeron las secciones posteriormente con un anticuerpo monoclonal conjugado con PE contra CD68 humano.

Resultados

Como se describe en el Ejemplo 1, huCRIg se clonó a partir de una biblioteca de ADNc fetal humano usando cebadores degenerados que reconocían los dominios de Ig conservados de JAM1 humano. La secuenciación de varios clones reveló una fase de lectura abierta de 321 aminoácidos (Figura 1, SEC ID N°: 2). Las búsquedas a través de Blast confirmaron la similitud con Z39Ig, una proteína transmembrana de tipo 1 (Langnaese *et al.*, Biochim Biophys Acta 1492: 522-525 (2000)). Más tarde se descubrió que a esta proteína de 321 aminoácidos le faltaba algunos de los restos de aminoácidos del extremo C. Se determinó que la proteína huSIgMA de longitud completa tenía 399 restos de aminoácidos, como se muestra en la Figura 2 (SEC ID N°: 4). La región extracelular de CRIg consistía en 2 dominios similares a Ig, que comprendían, un dominio combinado V N-terminal y un dominio combinado C2 C-terminal. Usando cebadores en 3' y 5', se clonó una variante de corte y empalme de CRIg, CRIg-corto (305 aminoácidos, Figura 3, SEC ID N°: 6), que carecía del dominio IgG proximal a la membrana.

Clonación del CRIg murino y comparación de secuencia con el CRIg humano

Usando la fase de lectura abierta completa del huCRIg y el algoritmo tblastn, se investigó en bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST) murinas. La secuenciación de ADN de 3 clones dio lugar a fases de lectura abierta completas idénticas de 280 aminoácidos. Los cebadores de las regiones 3' se usaron para clonar un transcrito de longitud completa de una biblioteca de bazo de ratón. El clon murino se asemejaba a la forma de corte y empalme de huCRIg en que éste carecía del dominio similar a Ig del extremo C. El dominio IgV extracelular estaba bien conservado entre el receptor humano y el murino con un 93 % de identidad. El dominio citoplasmático murino estaba mal conservado siendo 20 aminoácidos más corto que su homólogo humano y tenía una identidad del 40 %. El ácido nucleico que codificaba el CRIg murino (muCRIg) y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la Figura 4 y como SEC ID Nos: 7 y 8, respectivamente.

CRIg se expresa en un subconjunto de macrófagos residentes en diversos tejidos y su expresión aumenta cuando hay inflamación

El análisis de transferencia de Northern de huCRIg mostró dos transcritos de 1,5 y 1,8 kb (Figura 17), con la expresión más alta en la glándula adrenal, pulmón, corazón y placenta, y con la expresión más baja en otros órganos, tales como médula espinal, glándula tiroidea, glándula mamaria y ganglio linfático. En todos los tejidos, el transcrito de 1,8 kb fue el transcrito que se expresó más abundantemente y presumiblemente, codifica la forma larga de CRIg. Se detectó un solo transcrito de aproximadamente 1,4 kb en riñón y corazón de ratón.

Análisis de PCR en tiempo real TAQMAN™

Para identificar líneas celulares específicas que expresaban CRIg, se usaron PCR cuantitativa en tiempo real y cebadores/sondas específicos para el dominio de Ig N-terminal. Se descubrió expresión de ARNm baja pero detectable en la línea celular mieloide HL-60 tratada con PMA y en la línea celular monocítica THP-1. La expresión estaba ausente en líneas de células B y T (Figura 18A).

Expresión de CRIg en monocitos diferenciados.

Para establecer detalles acerca de cuándo se expresaba CRIg en monocitos/macrófagos en diferenciación, se determinaron los niveles de ARNm de CRIg en monocitos no adherentes y monocitos adherentes, inducidos para diferenciarse en presencia de suero humano autólogo. Los niveles de ARNm de CRIg aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo y alcanzaron niveles máximos 7 días después de la siembra en placa (Figura 18B). En esta fase de

diferenciación, los niveles de ARNm fueron 100 veces mayores en comparación con los de los monocitos indiferenciados.

La transferencia de Western de lisados de monocitos/macrófagos mostró un aumento de la expresión de la proteína CRlg (Figura 18C) en paralelo con el aumento de la expresión de ARNm de CRlg, indicando que CRlg se expresaba cuando los monocitos se diferenciaban para formar macrófagos. Una banda de 48 kDa y una banda de 40 kDa apareció en la transferencia, presumiblemente representando las formas corta y larga del CRlg humano.

Caracterización molecular de CRlg

El CRlg migró de forma similar en condiciones reductoras y no reductoras indicando que se expresaba como un monómero (Figura 19A). Solamente se observaron ligeros cambios en los patrones de migración cuando el CRlg se desglucosilaba usando PNGasa F, indicando una N glucosilación insignificativa. El CRlg se fosforiló cuando las células que sobreexpresaban CRlg se trataron con pervanadato (Figura 19B). El CRlg fosforilado migró como una proteína con un Pm ligeramente mayor (55 kDa). En células HEK 293 humanas, el dominio citoplasmático de CRlg fosforilado con tirosina no acumula Syk quinasa (resultados no mostrados).

Análisis por citometría de flujo de la expresión de CRlg en células mononucleares de sangre periférica

Para determinar el patrón de expresión de CRlg en los leucocitos circulantes, se realizaron análisis de citometría de flujo en linfocitos aislados de sangre de donantes sanos usando el anticuerpo monoclonal anti-CRlg humano 3C9. Los anticuerpos se prepararon inmunizando ratones Balb/C con el dominio extracelular de CRlg humano etiquetado con 8 His. El anticuerpo es un anticuerpo no bloqueante que puede usarse para detectar la proteína nativa en secciones congeladas fijadas con acetona directamente conjugado con ALEXA™ A488. Se realizó tinción de contraste con anticuerpos conjugados con PE para algunos antígenos de la superficie de células inmunitarias. CRlg estaba ausente en la superficie de todos los leucocitos, incluyendo linfocitos citolíticos naturales (*NK cells*) B y T, monocitos y granulocitos (Figura 20). Sin embargo CRlg se expresaba en monocitos cultivados durante 7 días en medio de diferenciación de macrófagos.

Regulación de la expresión de CRlg en monocitos

Para estudiar la regulación de la expresión de CRlg, se cultivaron macrófagos durante 7 días en presencia de diversas citocinas pro- y anti-inflamatorias y se determinaron los niveles de expresión de CRlg por PCR en tiempo real o análisis de flujo. La expresión del ARNm de CRlg aumentó después del tratamiento de los macrófagos durante 2 días con IL-10 y TGF- β y estaba regulada negativamente por IL-4, IL13 y LPS (Figura 21A). El tratamiento con dexametasona aumentó la expresión 5 veces en comparación con macrófagos control no tratados. Con el fin de determinar la regulación de CRlg expresado en la superficie celular, se realizó análisis de citometría de flujo en monocitos de sangre periférica tratados con diversas citocinas y dexametasona durante 5 días. Se detectó CRlg usando el clon 3C9 del anticuerpo monoclonal conjugado con ALEXA™ A488. Las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpos anti CD-14. Se encontró aumento de expresión de CRlg en la superficie después del tratamiento de los monocitos con IL-10 y LPS durante 5 días (Figura 21B). Se descubrió un drástico aumento en la expresión de CRlg en la superficie después del tratamiento con dexametasona.

Distribución subcelular de CRlg

Para estudiar la distribución subcelular de CRlg, durante 15 días se mantuvieron en cultivo macrófagos derivados de monocitos (MDM) después de los cuales estos se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal (clon 3C9) o con un anticuerpo policlonal de conejo 4F7 seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC y un anticuerpo anti CD63 marcado con PE. La microscopía confocal mostró alta expresión de CRlg en el citoplasma perinuclear, solapándose con la expresión de la proteína de la membrana lisosomal CD63 (Figura 22). También se expresó CRlg en los bordes anterior y posterior de los macrófagos donde su patrón de tinción no se solapaba con los de CD63.

Expresión de CRlg en tejidos normales y enfermos

Se estudió la expresión de CRlg en macrófagos residentes en tejidos y los cambios en su expresión en tejidos con enfermedades inflamatorias crónicas. Usando hibridación *in situ*, se determinó la expresión del ARNm de CRlg en paneles de tejidos humanos fijados en paraformaldehído. Se descubrieron altos niveles de expresión en macrófagos alveolares obtenidos de una autopsia pulmonar de un paciente con neumonía o asma crónica (Figura 23, A, B, C, y D). Se descubrió alto nivel de expresión de ARNm en células de Kupffer en el hígado de un paciente con hepatitis crónica (Figura 23, E y F).

En un estudio anterior (Walker, Biochimica et, Biophysica Acta 1574: 387-390(2002)), y explorando bibliotecas electrónicas, se descubrió alta expresión de ARNm de CRlg en el sinovio de pacientes con artritis reumatoide. Por lo tanto, se estudió el patrón de expresión de CRlg en el sinovio obtenido de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedad ósea degenerativa. Se descubrió alta expresión de ARNm de CRlg en células sinoviales obtenidas de un paciente con osteoartritis (Figura 24, B). Las células sinoviales de las capas superficiales tuvieron la

expresión más alta de CRlg (Figura 24, D). Además, se usó el anticuerpo policlonal 6F1 para estudiar la expresión de CRlg en secciones congeladas de sinovio humano obtenido de un paciente con artritis reumatoide. CRlg se expresaba en un subconjunto de células sinoviales (20-40 %) y en macrófagos tisulares en el sinovio (Figura 25, A, B, C. Estas células fueron, más probablemente, células sinoviales similares a macrófagos de tipo A. No había tinción en el sinovio control (Figura 25, D).

La expresión de la proteína CRlg se descubrió en macrófagos en diversos tejidos diferentes. Las secciones congeladas preparadas a partir de células CHO que expresaban de manera estable CRlg muestran localización de CRlg en la membrana (Figura 26 A). La proteína CRlg se descubrió en macrófagos alveolares (Figura 26, B), en histiocitos de la lámina propia del intestino delgado (Figura 26, C), en células de Hofbauer en la placenta (Figura 26, D), en macrófagos en la glándula adrenal (Figura 26, E) y en células de Kupffer en el hígado (Figura 26, F).

Las placas ateroscleróticas contenían un alto número de macrófagos o de células macrofágicas espumosas que se adherían fuertemente a la pared luminal de la aorta. Considerando el papel de CRlg en la adhesión de los macrófagos al endotelio, se estudió la expresión de CRlg en placas ateroscleróticas. Se tiñeron secciones alternas de placas con anti-CD63 (Figura 27, A y B) o con anti-CRlg (Figura 27, C y D). Se descubrieron patrones de tinción solapantes de anti-CD63 y CRlg en células espumosas alineadas en la pared de los vasos indicando un papel de CRlg en la aterosclerosis.

Para determinar si CRlg se expresaba selectivamente en macrófagos, se realizó doble tinción con inmunofluorescencia en macrófagos intersticiales del corazón (Figura 28). Tal como se muestra en la superposición (Figura 28, tercer panel) la mayor parte de los macrófagos intersticiales positivos para CRlg también fueron positivos para CD68. No todos los macrófagos CD68 positivos fueron positivos para CRlg, indicando que el último era específico para un subtipo de macrófagos residentes en los tejidos.

Para determinar cuantitativamente los niveles de expresión de ARNm en el síndrome de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), se extrajo ARNm de tejido de colon obtenido de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o de pacientes sin manifestación de EII. Se realizó PCR en tiempo real usando cebadores específicos para CRlg, para medir los niveles de expresión relativa. Los niveles de expresión fueron 16 veces más altos en un paciente con colitis ulcerosa, y 5 veces más altos en un paciente con enfermedad de Crohn, en comparación con un tejido control (Figura 29, A). De modo similar, se determinaron los equivalentes de ARN relativos en tejido de pulmón y se descubrió que eran más altos en tejidos de un paciente con enfermedad pulmonar oclusiva crónica (EPOC: 14 veces por encima de lo normal) y que no diferían significativamente de lo normal en un paciente con asma (Figura 29, B).

Es bien sabido que las moléculas de la superfamilia de Ig actúan como mediadoras en el reconocimiento de la superficie celular y adhesión de célula a célula. Dado que la expresión de CRlg fue alta en macrófagos intersticiales que se alinean en los vasos sanguíneos, se estudió la implicación de CRlg en la adhesión celular endotelial de macrófagos. Una línea de células Jurkat, transfectada de manera estable con CRlg-largo de longitud completa (Figura 30A), se cargó con el colorante fluorescente BCECF y se añadió a los pocillos de una placa maxisorb de 96 pocillos en la que se había cultivado una monocapa de células HUVEC. La adhesión se midió a través de la cantidad de fluorescencia retenida después de 3 lavados suaves. Las células Jurkat que expresaban CRlg fueron más adherentes tanto al endotelio control como al estimulado con TNF- α , en comparación con las células Jurkat transfectadas de manera estable con un plásmido control (Figura 30B).

Análisis

En este estudio se describe, por primera vez, la distribución tisular, la regulación de la expresión y la caracterización molecular de un nuevo miembro de la superfamilia de Ig, CRlg/Z39lg, y se confirma su expresión selectiva en macrófagos residentes en tejidos.

La expresión de CRlg se descubrió en macrófagos residentes que tenían un fenotipo completamente diferenciado. Su expresión estaba aumentada en tejidos con inflamación crónica al igual que en los de artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria intestinal. El aumento de la expresión de CRlg en estas enfermedades, que a menudo se caracterizaban como enfermedades de tipo Th2, puede estar en línea con la regulación de su expresión mediante citocinas Th2 *in vitro*. Si este aumento de expresión se debe a un aumento de la presencia de macrófagos positivos a CRlg o a un aumento de expresión de los macrófagos inflamatorios, está aún por determinar.

CRlg puede actuar con mediador en una de las funciones efectoras de los macrófagos humanos, que incluyen el reconocimiento bacteriano, la fagocitosis, la presentación de antígenos y la liberación de citocinas. Estos resultados indicaron un papel de CRlg en la adhesión, y posiblemente en la movilidad, de los macrófagos en la pared celular endotelial de los vasos.

La expresión de CRlg estaba aumentada en enfermedades inflamatorias no microbianas como la colitis ulcerosa y la enfermedad pulmonar oclusiva crónica (EPOC) pero estaba regulada negativamente en macrófagos aislados después de tratamiento con LPS o con otro componente de la pared celular bacteriana, tal como el ácido lipoteicoico y la lipoproteína bacteriana. El tratamiento prolongado, durante 2 días, con LPS produjo un aumento en la expresión

de CRlg. Esto podía deberse a un efecto autocrino de la IL-10 secretada por macrófagos estimulados con LPS. Se observó una regulación positiva llamativa de CRlg, tanto a niveles de ARNm como de proteínas, después de tratamiento de monocitos o macrófagos con dexametasona. Se ha descubierto que unos pocos receptores de superficie de monocitos/macrófagos aumentan su expresión después de tratamiento con dexametasona. Un ejemplo es CD163, pero su inducción por dexametasona es mucho menos drástica. La regulación positiva de CRlg mediante citocinas antiinflamatorias IL10 y TGF β fue de considerable interés e indica que CRlg puede actuar como mediador en el papel antiinflamatorio de los glucocorticosteroides.

Como se describe en el presente documento, CRlg se expresó en un subconjunto de macrófagos CD68 positivos que pueden representar macrófagos activados. Usando anticuerpos bloqueantes y activadores contra CRlg y la proteína de fusión CRlg-Fc, se ha investigado su papel en la función efectora de macrófagos, en la adhesión y migración y su papel en enfermedades inflamatorias crónicas, y se describe en el Ejemplo 7.

Solamente unos pocos marcadores de la superficie celular se expresaron específicamente en macrófagos diferenciados, tales como CD68 y CD163. Aunque CD68 se expresó aparentemente en todas las poblaciones de macrófagos humanos, el antígeno pudo también detectarse en otras células mieloides y también en determinadas células no mieloides. Por lo tanto, CRlg representa el primer antígeno de la superficie celular que se expresa selectivamente en un subconjunto de macrófagos maduros intersticiales.

Ejemplo 7

Proteínas de fusión CRlg en artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA-1J

Este experimento tenía el objetivo de comparar proteínas de fusión CRlg con las de IgG1 murina control en el desarrollo de enfermedad y progresión de AIC (artritis inducida por colágeno, un sistema de modelo animal experimental de artritis reumatoide).

Como se explica en el Ejemplo 4, CRlg se expresa alta y específicamente en un subconjunto de macrófagos y se encuentra en gran cantidad en tejidos con inflamación crónica. El CRlg murino tiene alta expresión en macrófagos y sinoviocitos en las articulaciones inflamadas de ratones con artritis inducida por colágeno. Estudios realizados *in vitro* han mostrado que CRlg está implicado en la adhesión de los macrófagos al endotelio. La proteína de fusión CRlg-Fc influye en el transcurso de una enfermedad autoinmunitaria, en este caso artritis inducida por colágeno en ratones, bien influyendo en las propiedades de los macrófagos tisulares o influyendo en la respuesta inmunitaria de otras células (por ejemplo, células T, células B, células epiteliales, células endoteliales). Esto puede dar como resultado el alivio de la inflamación, hinchazón y desgaste de hueso prolongado en las articulaciones.

Se generó una proteína de fusión muCRlg-Fc fusionando la bisagra, dominios CH2 y CH3 de la IgG1 murina, con el dominio extracelular (1-200 aa) del CRlg murino. Se usó una fusión que contenía una mutación doble que impedía que el receptor de Fc se uniera, para controlar la regulación del receptor de Fc. La secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión muCRlg-Fc se muestra como SEC ID N°: 17. (Las secuencias codificantes de huCRlg-Ig y de huCRlg-corto-Ig similares se muestran como SEC ID Nos: 15 y 16, respectivamente). La proteína se produjo en células CHO mediante transfecciones transitorias de ADN plasmídico. La proteína de fusión se purificó procesando el sobrenadante celular sobre una columna de proteína A seguido de cromatografía de intercambio iónico para eliminar agregados. La semivida en suero se estimó inyectando una sola dosis de CRlg-Fc de 4 mg/kg a un ratón C57B6 seguido de obtención del suero del ratón a intervalos de tiempo específicos. Los niveles en suero de CRlg murino-Fc se determinaron mediante un ELISA de tipo sándwich usando AcM anti CRlg que reconocían diferentes epítopos del dominio extracelular de CRlg.

Especies de modelos animales: Ratón

Cepa (cepas): DBA-1J

Proveedor (proveedores): JACKSON

Intervalo de edad: de 7 a 8 semanas de vida

Se escogió el ratón como especie para estudiar la artritis inducida por colágeno (AIC) debido a que la AIC es una poliartitis inflamatoria con características clínicas y patológicas similares a las de la artritis reumatoide (AR) en seres humanos. Este modelo animal se ha utilizado en muchos laboratorios y la histopatología de la AIC se asemeja a la observada en la AR con proliferación sinovial que progresa a formación de *pannus*, degeneración/destrucción del cartílago y desgaste óseo marginal con deformidad articular posterior. También, el animal es el mamífero filogenéticamente más inferior. Además, no existe ningún modelo *in vitro* disponible para imitar la patogénesis compleja, multifactorial, de la AR.

Diseño experimental

Grupos de tratamiento:

- 1) isotipo mIgG1 6 mg/kg en solución salina subcutánea (SC) 200 µl 3 veces/semana durante 7 semanas (n=8).
- 2) isotipo muCRlg 4 mg/kg en solución salina SC 100 µl 3 veces/semana durante 7 semanas (n=8).

Se inmunizó a los ratones por vía intradérmica con CII bovino (100 ug, Sigma, St Louis) emulsionado en CFS (Difco). Los ratones volvieron a exponerse a CII en API (Difco) 21 días más tarde. Comenzando el día 24, un grupo de ratones (n = 7) recibió 100 ug de muCRlg (PRO362) Fc tres veces a la semana durante seis semanas, y el segundo grupo (n = 8) recibió 100 ug de IgG1 murina, como control. Se examinó a los ratones diariamente para determinar los signos de inflamación articular y se puntuaron del siguiente modo: 0, normal; 1, eritema e hinchazón leve confinada a la articulación del tobillo; 2, eritema e hinchazón leve que se extendía del tobillo a las articulaciones del metatarso y del metacarpo; 3, eritema e hinchazón moderada que se extendía del tobillo a las articulaciones del metatarso y del metacarpo, 4, eritema e hinchazón grave que se extendía del tobillo a los dedos. La máxima puntuación artrítica por pata fue de 4, y la máxima puntuación por ratón fue de 16 (Figura 31).

Se inmunizó a todos los ratones con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de Adyuvante completo de Freund (CFA) el día 0. El colágeno de tipo II en CFA se inyectó por vía intradérmica en la base de la cola en el lado derecho. El día 21, se proporcionó por vía i.d. una 2ª inmunización con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund en el lado izquierdo de la cola. El personal de investigación examinaba a los todos los días (de L a V). Como dispositivo de enriquecimiento y para proporcionar un extra acolchamiento a los animales se usaron nidificaciones (*nestlets*). Siempre que fue necesario, se proporcionó alimento humedecido en el fondo de las jaulas. Los animales debilitados se sacrificaron después de consultar con el personal veterinario. Al final del estudio se tomaron rayos X faxitrón terminales y una microCT (microfotografía computarizada) y se evaluaron las lesiones/desgastes articulares. Además, los animales se pesaron antes y después del tratamiento.

El día 35 y al final del estudio, se extrajo sangre de los ratones de los Grupos 1 a 8 para determinar la pK en suero y para determinar el título de anticuerpos anti colágeno de tipo II (100 µl de sangre orbital).

El día 70 se extrajo sangre por vía intracardiaca definitivamente a todos los ratones con isoflurano al 3% para realizar un hemograma terminal, para un recuento leucocitario diferencial y para la evaluación de pK en suero (G3).

Los ratones se sacrificaron el día 70, después de la inducción de artritis. Se recogieron las cuatro extremidades para efectuar las radiografías, la microCT y la histopatología.

Resultados

La inyección sistémica de la proteína de fusión CRlg, muCRlg-Fc, a un ratón con artritis inducida por colágeno (modelo animal para la artritis reumatoide) mostró una reducción significativa (véase la Figura 31: valor p = 0,0004) en la progresión de la AIC en el grupo de ensayo de ratones que recibieron la proteína de fusión CRlg (cuadrados) frente al grupo de ratones control que recibieron IgG1 (círculos). La artritis inducida por colágeno se indujo mediante inyección de colágeno bovino de tipo II emulsionado en adyuvante completo de Freud. Se dio una inmunización de refuerzo 21 días después de la primera inmunización. Se trató a los animales 3 veces por semana bien con la proteína de fusión CRlg-Fc o con anti gp120 IgG1. La dosificación fue de 4 mg/kg en 100 ul de PBS subcutáneo. El tratamiento comenzó el día 21 y continuó hasta el día 70. Se observó a los ratones diariamente para determinar la hinchazón de pata trasera como un signo de artritis. La gravedad de la artritis se calificó en una escala de 1 a 16 del siguiente modo: 0 = Sin pruebas de eritema ni de hinchazón, 1 = Eritema e hinchazón leve confinada al mediopié (tarso) o tobillo, 2 = Eritema e hinchazón leve que se extiende del tobillo al mediopié, 3 = Eritema e hinchazón moderada que se extiende del tobillo a las articulaciones del metatarso, 4 = Eritema e hinchazón grave que abarca el tobillo, el pie y los dedos.

Experimento de repetición

El protocolo anteriormente descrito se modificó para repetir y confirmar los resultados del experimento anterior en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC). El protocolo modificado incluyó la investigación del posible efecto de la exposición a radiación como resultado de la formación de imágenes de microCT *in vivo* durante la enfermedad y durante el desarrollo de la progresión.

Setenta ratones DBA1/J (de 7 a 8 semanas de vida, Jackson Laboratories) se dividieron en 5 grupos de tratamiento, dos grupos (G1 y G3) con 15 ratones por grupo, dos grupos (G4 y G5) con 10 ratones por grupo, y un grupo (G2) con 20 ratones.

Grupos de tratamiento:

- G1: isotipo muIgG1 4 mg/kg en solución salina 100 µl, s.c., 3 veces por semana durante 7 semanas (n=15).
- G2: isotipo muCRlg-IgG1 4 mg/kg en solución salina 100 µl, s.c., 3 veces por semana durante 7 semanas (n=20).
- G3: isotipo muTNFRll-IgG1 4 mg/kg en solución salina 100 µl, s.c., 3 veces por semana durante 7 semanas (n=15).

G4: isotipo muIgG1 4 mg/kg en solución salina 100 µl, s.c., 3 veces por semana durante 7 semanas, anestesia con microCT *in vivo* (n=10).

G5: isotipo muTNFRII-IgG1 1,0 mg/kg en solución salina 100 µl, s.c., 3 veces por semana durante 7 semanas, anestesia con microCT *in vivo* (n=10).

El TNF es una citocina secretada por fagocitos mononucleares, células T estimuladas con Ag, linfocitos citolíticos naturales (células NK) y mastocitos. Está implicado en respuestas inflamatorias e inmunitarias normales. El TNF- α juega un papel importante en la patogénesis de la artritis reumatoide (AR). Se descubrieron niveles elevados de TNF en fluido sinovial de pacientes con AR. En este protocolo, se usó mTNFRII-Fc como control positivo, para bloquear la interacción entre el TNF y sus receptores de la superficie celular.

Todos los ratones de los grupos G1 a G5 se inmunizaron con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de Adyuvante Completo de Freund (CFA) el día 10. El colágeno de tipo II en CFA se inyectó por vía intradérmica en el lado derecho de la base de la cola. El día 21, se proporcionó una segunda inmunización con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de Adyuvante incompleto de Freund por vía intradérmica en el lado izquierdo de la cola.

Los animales se examinaron todos los días. Los ratones de los grupos G4-5 se anestesiaron con isoflurano y se les realizó una microCT *in vivo* semanalmente. Los rayos X faxitrón terminales y la microCT se tomaron al final del estudio, y se evaluaron las lesiones/desgastes articulares.

El día 35 y al final del estudio, a los ratones de los grupos G1-5 se les extrajo sangre para evaluar la pK en suero y el título de anticuerpos anti colágeno de tipo II (100 µl de sangre orbital). El día 70 se extrajo sangre por vía intracardiaca definitivamente a todos los ratones con isoflurano al 3% para realizar un hemograma terminal, para un recuento leucocitario diferencial y para la evaluación de pK en suero (G3).

Los ratones se sacrificaron el día 70, después de la inducción de artritis. Se recogieron las cuatro extremidades para efectuar radiografías, la microCT y la histopatología.

La Figura 33 muestra una reducción significativa de la hinchazón articular en los ratones tratados con CRlg-Fc.

La inmunohistoquímica realizada en tejido fijado en formalina, incluido en parafina (tinción H&E), obtenida de los animales tratados con muCRlg-Fc el día 70, muestra inhibición de inflamación articular como resultado del tratamiento. La Figura 34 muestra secciones teñidas con H&E de una articulación del metatarso de un ratón DBA1/J 70 días después de la inmunización con colágeno de tipo II. A. Se descubrió un infiltrado masivo de células inflamatorias en las zonas que rodeaban las vainas del tendón y en la zona que rodeaba la cavidad articular; B. Detalle de A; C. Bajo grado de infiltrado inflamatorio en la articulación de un ratón tratado con CRlg-Fc. Se encontraron pocas células inflamatorias en las zonas que rodeaban las vainas del tendón y la cavidad articular; D. Detalle de B.

La Figura 35 muestra que el volumen óseo cortical se conservó en las articulaciones de los ratones tratados con muCRlg-Fc. Los ratones de los grupos tratados con IgG control y CRlg-Fc se sacrificaron 70 días después de la inyección con colágeno, y las articulaciones se escanearon mediante μ CT. El desgaste óseo y la pérdida de densidad ósea en las articulaciones de los ratones representativos de los grupos tratados con CRlg-Fc y con control, se muestran a la izquierda de la figura en comparación con los animales tratados con muIgG1. La conservación del volumen óseo cortical fue significativamente mayor en los animales tratados con muCRlg-Fc. Las imágenes son de una interpretación de la superficie tridimensional creada a partir de los datos de μ CT usando el programa informático de análisis de imágenes Analyze.

La Figura 36 muestra que el tratamiento con CRlg-Fc no altera el número ni la morfología de macrófagos residentes en tejidos. Los hígados y pulmones de los ratones tratados bien con anti-gp120 IgG1 (figuras de la izquierda) o CRlg-Fc (figuras de la derecha) se diseccionaron, se fijaron en formalina y se incluyeron en cera de parafina. Se tiñeron secciones de siete micrómetros usando un anticuerpo contra F4/80. El examen cuidadoso de las secciones muestra los mismos números de macrófagos F4/80 positivos en ambos grupos de tratamiento. Además, no se observaron diferencias en la morfología de los macrófagos.

La Figura 37 muestra que el tratamiento con muCRlg-Fc no afecta a los títulos en suero de los anticuerpos anti-colágeno. Los títulos en suero de los anticuerpos anti-colágeno se determinaron 70 días después de la inmunización. No se encontraron diferencias en los títulos en suero de las subclases de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgM en los animales tratados con CRlg-Fc frente a los tratados con anti gp120. Esto significa que CRlg-Fc no afecta a las respuestas de los anticuerpos en los ratones inmunizados con colágeno de tipo II. La Figura 38 muestra que muCRlg-Fc disminuye el número de macrófagos inflamatorios circulantes. La sangre periférica se obtuvo de animales tratados con CRlg-Fc y anti gp-120, 70 días después de la inmunización y se analizó por citometría de flujo usando marcadores para monocitos inflamatorios y no inflamatorios. Los animales tratados con CRlg-Fc mostraron un aumento significativo del número de monocitos inflamatorios y una disminución del número de monocitos no inflamatorios en comparación con el grupo tratado con anti gp120.

En conclusión, los resultados de los experimentos descritos en el presente Ejemplo demuestran que la proteína de fusión muCRlg-Fc inhibe la artritis inducida por colágeno. En particular, los resultados muestran que CRlg-Fc inhibe la hinchazón articular, inhibe la inflamación, conserva el volumen óseo articular cortical, y disminuye el número de macrófagos inflamatorios circulantes.

Otros experimentos han mostrado que CRlg-Fc no afecta a las respuestas de las células B o T *in vivo*.

Ejemplo 8

Proteínas de fusión de CRlg en AIC mediada por anticuerpos en ratones

La artritis mediada por anticuerpos se diferencia de la artritis inducida por colágeno en que en lugar de inyectar el antígeno (colágeno bovino de tipo II), se inyectan anticuerpos que reconocen el colágeno de tipo II. De este modo, se superan las respuestas adaptativas de células B y T para inducir directamente funciones efectoras en macrófagos y neutrófilos a través del receptor de Fc y la activación mediada por el complemento.

La AIC mediada por anticuerpos puede inducirse mediante inyección i.v. de una combinación de cuatro anticuerpos monoclonales diferentes generados por las líneas celulares de hibridoma B de ratón Arthrogen-CIA® (Terato *et al.*, J. Immunol. 148: 2103-8 (1992)). Tres de los anticuerpos monoclonales reconocen epítopos autoantigénicos agrupados dentro de un fragmento de 84 restos de aminoácidos, LyC2 (el fragmento artrítico más pequeño del colágeno de tipo II) de CB11 y el cuarto anticuerpo monoclonal reaccionan con LyC1. Los cuatro anticuerpos reconocen los epítopos conservados compartidos por diversas especies de colágeno de tipo II y reaccionan en cruzado con colágenos de tipo II homólogos y heterólogos (Terato *et al.*, anteriormente mencionado; Terato *et al.*, Autoimmunity 22: 137-47 (1995)). El cóctel de anticuerpos monoclonales inductor de artritis Arthrogen-CIA® se encuentra disponible en el comercio (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, N° de catálogo 90035).

Protocolo

10 ratones BALB-c (CR/Hollister) de 4-5 semanas, se dividieron en dos grupos con 5 ratones cada uno de ellos.

Se trató a los animales diariamente con 100 µg de muCRlg-Fc o 100 µg de control-Fc (anti-gp120 IgG1), comenzando el día antes de la inyección del cóctel de anticuerpos (día -1) y continuando hasta el día 14. El día 14, los animales se examinan al menos dos veces al día, y se guardan las anotaciones de las observaciones registradas. El grado de la enfermedad se puntuó por observación visual.

Sistema de puntuación visual:

- 0 = Sin evidencias de eritema e hinchazón
- 1 = Eritema e hinchazón leve confinada al mediopé
- 2 = Eritema e hinchazón leve que se extiende del tobillo hasta el mediopé
- 3 = Eritema e hinchazón moderada que se extiende del tobillo a las articulaciones del metatarso.
- 4 = Eritema e hinchazón grave que abarca el tobillo, el pie y los dedos

Como dispositivo de enriquecimiento y para proporcionar un extra acolchamiento a los animales se usaron nidificaciones (*nestlets*)

Todos los animales se sacrificaron el día 14, y las articulaciones se recogieron para realizar tinción inmunohistoquímica o tinción con hematoxilina-eosina. La sangre se muestreó para realizar análisis hematológico.

Resultados

La Figura 39 muestra infiltración de macrófagos en articulaciones después de artritis inducida por anticuerpos (AIA), generada con tinción F4/80 en articulaciones congeladas no descalcificadas. A los ratones hembra Balb/C se les inyectaron 2 mg de anticuerpos anti colágeno (andrógeno) i.v. seguido 3 días después de inyección con 25 µg de LPS i.p. Catorce días después de la inyección de anticuerpos, se sacrificó a los ratones y se extrajeron las patas, y se incluyeron en alcohol polivinílico. Se cortaron secciones de 7 µm de espesor de las articulaciones congeladas y se tiñeron con anticuerpos contra CRlg murino y contra F4/80, un marcador específico de macrófagos.

La Figura 40 demuestra que el muCRlg previene la hinchazón articular después de artritis inducida por anticuerpos en ratones Balb/c. La artritis se indujo mediante el método de Terato y colaboradores (Terato *et al.*, (1992), anteriormente mencionado; Terato *et al.*, (1995) anteriormente mencionado) usando una mezcla de 4 anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo conservado en colágeno de tipo II (Chemicon). A los ratones hembra Balb/C, de 6 semanas de vida, se les inyectaron i.v. 2 mg de anticuerpo anti CII seguido 3 días después de una inyección i.p. de 25 µg de LPS. Los animales se trataron diariamente bien con proteína de fusión CRlg murino-Fc o con una proteína de fusión control-Fc. La dosificación fue de 4 mg/kg en 100 µl de PBS subcutáneo. El tratamiento

comenzó el día antes de la inyección del anticuerpo anticolágeno y continuó hasta que los ratones se sacrificaron el día 14. Los ratones se examinaban diariamente después de la inyección con LPS para evaluar la hinchazón de las patas traseras como un signo de artritis. La gravedad de la artritis se puntuó sobre una escala de 1 a 16 del siguiente modo: 0 = Sin evidencia de eritema e hinchazón, 1 = Eritema e hinchazón leve confinada al mediopié (tarsal) o tobillo, 2 = Eritema e hinchazón leve que se extiende del tobillo al mediopié, 3 = Eritema e hinchazón moderada que se extiende del tobillo a las articulaciones del metatarso, 4 = Eritema e hinchazón grave que abarca el tobillo, el pie y los dedos

El tratamiento terapéutico se realizó de modo similar al tratamiento profiláctico salvo que el inicio del tratamiento fue el día 4 en lugar del día 1. El tratamiento con muCRlg-Fc redujo los niveles de citocinas inflamatorias en las patas de los ratones con AIA. La medición de la concentración de las citocinas, C3a y C5a, en las patas traseras artríticas se realizó de acuerdo con el método de Kagari *et al*, J. Immunol. 169: 1459-66 (2002). En resumen, a los tiempos indicados después de la inducción de la artritis inducida por anticuerpos, se recogieron las patas y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente, se pulverizaron las patas en una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido y se dispersaron en PBS enfriado en hielo que contenía PMSF al 0,1 % (Sigma). Las muestras se homogeneizaron en hielo con un homogeneizador Vitatron (NL), las partes insolubles se eliminaron centrifugando a 14.000 g durante 10 min y recogiendo el sobrenadante. Las citocinas del sobrenadante se midieron usando ELISA para citocinas de BD Pharmingen.

El tratamiento con muCRlg-Fc inhibe la deposición de C3 del complemento pero no de IgG2a en cartílago en AIA. A los ratones hembra Balb/C se les inyectaron 2 mg de anticuerpos anti colágeno (artrógeno) i.v. seguido 3 días más tarde por inyección de 25 ug de LPS i.p. 14 días después de la inyección de los anticuerpos, los ratones se sacrificaron y se extrajeron las patas, se incluyeron en alcohol polivinílico y se congelaron en isopentano enfriado en hielo seco. Se cortaron secciones de 7 um de espesor a partir de las articulaciones congeladas y se tiñeron con un anticuerpo policlonal acoplado a FITC contra C3 murino (Calbiochem) y con un anticuerpo policlonal acoplado a A594 contra la IgG2a murina (Jackson ImmunoResearch). Se fotografiaron las secciones en un microscopio de fluorescencia Leitz.

Los resultados de inmunohistoquímica realizados con la tinción de H&E se muestran en la Figura 41. Los ratones tratados con control (muIgG1) tuvieron artritis de moderada a grave (panel izquierdo), los ratones tratados con muCRlg tuvieron una mínima artritis, o no la tuvieron (panel derecho). Los resultados muestran que muCRlg inhibe la inflamación articular en artritis inducida por anticuerpos.

En conclusión, los animales tratados con CRlg murino-Fc tuvieron puntuaciones clínicas significativamente reducidas en comparación con los animales tratados con anti-gp120 IgG1. CRlg demostró eficacia tanto profiláctica como terapéutica en este modelo animal. La disminución de la gravedad de la artritis también estaba reflejada por una disminución de las células inflamatorias, especialmente neutrófilos, en las articulaciones. Hubo un número aumentado de neutrófilos en la circulación que posiblemente reflejaba una disminución de la migración de los neutrófilos en las articulaciones. El muCRlg inhibió la producción local de IL-1 β e IL-6 en paralelo con la manifestación clínica de AR. El tratamiento con muCRlg no afectó a la deposición de complejo inmunitario, pero inhibió la deposición de C3 del complemento en el cartílago. Se descubrió que la función efectora era independiente de la unión al receptor de Fc. El huCRlg-corto-Fc también demostró actividad profiláctica significativa.

Ejemplo 9

El CRlg-Fc murino se une a glóbulos rojos de oveja opsonizados con C3 (E-IgM)

Se recubrieron GRO (Glóbulos rojos de oveja) (MP Biomedicals, ICN/Cappel) con IgM de rata (E-IgM) (Forssman Ag, Pharmingen). Las E-IgM se opsonizaron con suero normal de ratón o con suero de ratón C3 knockout. Las E-IgM opsonizadas se incubaron con distintas concentraciones de CRlg murino-Fc. La unión de la proteína de fusión a E-IgM se controló por citometría de flujo usando un anticuerpo marcado con FITC para la parte Fc de la proteína de fusión.

Como se muestra en la Figura 43, el CRlg murino se unió de un modo dependiente de la dosis a las E-IgM opsonizadas con el suero normal de ratón pero no a las E-IgM opsonizadas con suero deficiente en C3, indicando la unión selectiva de CRlg al C3 murino o a un fragmento de C3.

Ejemplo 10

La unión de CRlg humano-Fc a E-IgM es dependiente de C3

Se recubrieron GRO (MP Biomedicals, ICN/Cappel) con IgM de rata (E-IgM) (Forssman Ag, Pharmingen). Las E-IgM se opsonizaron con suero humano deficiente en C3 o en C5. Las E-IgM opsonizadas se incubaron con distintas concentraciones de CRlghumano-Fc. La unión de la proteína de fusión a E-IgM se controló por citometría de flujo usando un anticuerpo marcado con FITC para la parte Fc de la proteína de fusión.

Tal como se muestra en la Figura 44, el CRlg humano se unió de manera dependiente de la dosis a E-IgM opsonizada con suero deficiente en C5 pero no a E-IgM opsonizadas con suero deficiente en C3, indicando la unión selectiva de CRlg al C3 humano o a un fragmento de C3. Se obtuvieron resultados similares con el DEC de CRlg.

5 Ejemplo 11

Unión de partículas opsonizadas con suero a células CHO que expresan CRlg

10 Se mezclaron 50 µl de suero de hembras C57B6 + 20 µg/ml de mCRlg-mFc (PUR5270-B) o mPIGR-mFc (4699) conjuntamente. Se añadieron partículas de A488, zmosano, *S. aureus* o *E. coli* de Molecular Probes durante 60 minutos a 37 °C en PBS/gelatina al 0,2 %/glucosa al 0,18 %/MgCl₂ 1 mM (PBSgg++). Las partículas opsonizadas se lavaron 2x en PBS y se añadieron a las células CHO que expresaban CRlg murino (clon 5C10) o JAM2 humano en presencia o ausencia de la proteína CRlg-Fc o control-Fc durante 30 minutos a 37 °C. Las células se lavaron 2x en PBS y se analizó la unión de partículas a la superficie celular en un Calibrador FACS.

15 Tal como se muestra en la Figura 45, las partículas opsonizadas con suero con suficiente C3 se unieron a las células CHO que expresaban CRlg pero no a las células CHO que expresaban JAM2. La unión se anuló en presencia de una proteína de fusión CRlg-Fc pero no en presencia de una proteína de fusión control-Fc indicando que el sitio de unión para CRlg a C3b reside en el dominio extracelular.

20 Ejemplo 12

MuCRlg Fc se une a C3b

25 Se realizaron ensayos de resonancia de plasmón superficial controlados en tiempo real usando un instrumento Biacore®-2000, y los datos se analizaron usando el programa informático BiaEvaluation 3.0 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Las microplacas de dextrano carboxilado (microplacas detectoras CM5, para uso en investigación de Biacore AB) se usaron en todos los ensayos. Las células de flujo de las microplacas CM5 se usaron bien para un procedimiento de acoplamiento con aminas convencional o se prepararon para el acoplamiento enzimático directo de C3b usando un procedimiento de activación-desactivación convencional sin añadir ninguna proteína entre las etapas. La etapa de activación se realizó con una solución reciente que contenía *N*-hidroxisuccinimida y *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (Biacore AB, 7-15-min de inyección a un caudal de 5 µl/min) y continuó por desactivación con HCl-etanolamina (1,0 M a pH 8,5) (Biacore AB, 7-15-min de inyección). Se usó Hepes salino tamponado (Biagrade, Biacore AB) o VBS como tampón de flujo a través. Después de estas etapas iniciales se usó HBS o VBS como tampón de flujo continuo a 5 µl/min; solamente se usaron tampones desgasificados.

30 *Acoplamiento con aminas de las Proteínas en la microplaca Biacore®* — C3b, iC3b, C3c y C3d se acoplaron en la microplaca CM5 usando un procedimiento de acoplamiento con aminas convencional tal como recomienda el fabricante. Las proteínas a acoplar se dializaron contra tampón acetato 10 mM (pH 5,0-5,7) para conseguir una carga neta negativa para el acoplamiento con aminas. Brevemente, se activó la superficie de la microplaca con *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (7-15-min de inyección, 5 µl/min), y se inyectó bien C3b (50 µg/ml, 20 µl), o C3c (70 µg/ml, 30 µl) o C3d (130 µg/ml, 20 µl) purificado para conseguir un nivel apropiado de acoplamiento para los experimentos de unión, es decir, de 1.000 a 5.000 unidades de resonancia (UR). Después, las celdas de flujo se desactivaron tal como se describe anteriormente. Antes de realizar los experimentos, las células de flujo se lavaron a fondo con VBS y NaCl 3 M en tampón acetato 10 mM, pH 4,6.

35 *Ensayos de Unión Usando Biacore®* - se ensayó la unión de CRlg-Fc a C3b, C3c y C3d acoplado a aminas. Para las inyecciones en el Biacore® se dializaron los reactivos contra VBS, se diluyeron con VBS y se filtraron (0,20 µm Minisart®, Sartorius Corp., Edgewood, NY) o se centrifugaron (10 minutos a 14.000 x g). Las concentraciones de proteína de los reactivos dializados se midieron usando el Ensayo de Proteínas BCA (Pierce). Las proteínas de fusión se inyectaron por separado a través de una celda de control de flujo (celda de flujo activado y desactivado sin ninguna proteína acoplada, "canal del blanco") y a través de la celda de flujo con la proteína acoplada usando un caudal de 5 µl/min a 22 °C. Todos los ensayos de unión se realizaron al menos por duplicado usando microplacas detectoras preparadas independientemente.

40 Tal como se muestra en la Figura 46, el CRlg-Fc murino muestra unión específica de C3b a la microplaca detectora con una K_d calculada de 250 nM.

45 Ejemplo 13

La proteína de fusión CRlg de ratón y de ser humano - Fc se une al C3b del complemento

50 Se recubrieron placas Maxisorb durante toda la noche C1, C3a,b,c,d, C4, C6 con 3 µg/ml en PBS. Se bloquearon las placas durante 2 h en PBS + BSA al 4 % y se incubaron con diversas concentraciones de la proteína de fusión CRlg humano o murino-Fc durante 1 h a Ta en PBS+BCA al 4 % + Tween al 0,1 %. Se lavaron las placas y se incubaron

65

con un anticuerpo de cabra anti-Fc de ratón o anti-Fc de ser humano conjugado con peroxidasa. Después de los lavados, se incubaron las placas con sustrato TNB y se leyó la DO en un lector de placas.

Los resultados que se muestran en la Figura 47 representan un aumento dependiente de la concentración en la unión de CRlg murino y humano a C3b, C3c y C3bi y la ausencia de unión a C1, C2, C4, C3a y C3d.

Ejemplo 14

La proteína de fusión CRlg de ratón y de ser humano - Fc inhibe la deposición de C3 en zimosano

La inhibición de la ruta alternativa se estudió usando un método que utiliza análisis por citometría de flujo de la deposición de C3 en partículas de zimosano A (Sigma) (Quigg *et al.*, J. Immunol. 160: 4553-4560 (1998)). Brevemente, primero se activaron 50 mg de partículas de zimosano en 10 ml de NaCl 0,15 M llevando a ebullición durante 60 minutos, seguido de dos lavados en PBS. En cada condición del ensayo de la ruta alternativa, se añadieron 2×10^7 partículas a los tubos de reacción que contenían una concentración final de EGTA 10 mM y $MgCl_2$ 5 mM. Después, se añadieron las muestras descritas en el texto, que contenían bien EDTA 10 mM (control negativo) o cantidades crecientes de CRlg murino-Fc. Se añadieron 10 microlitros de suero de BALB/c como una fuente del complemento, y todas las muestras se llevaron a 100 μ l con PBS. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 minutos, y la reacción se detuvo añadiendo EDTA 10 mM. Las partículas se centrifugaron, y los sobrenadantes se recogieron y se congelaron para el análisis posterior. Las partículas se lavaron después dos veces con PBS frío, BSA al 1 %, y después se incubaron con anticuerpo de cabra anti-C3 de ratón conjugado con FITC (Cappel, Durham, NC) durante 1 h en hielo. Las muestras se lavaron después dos veces en PBS frío, BSA al 1 %, se resuspendieron en PBS, y después se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro EPICS (Coulter, Hialeah, FL). El porcentaje de inhibición se calculó usando la fórmula $[1 - \text{fluorescencia media del canal de la muestra} - \text{fondo (condición del EDTA 10 mM)}] / \text{fluorescencia media del canal del control positivo (sin Crry-Ig)} - \text{fondo}] \times 100$.

Los sobrenadantes de la reacción también se analizaron por transferencia de Western para determinar el grado de escisión de C3. En este análisis, se mezclaron 5 μ l del sobrenadante con la misma cantidad de tampón de carga de SDS-PAGE con 2-ME al 10 %. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 7,5 %, se transfirieron a un papel de quimioluminiscencia potenciada de Hybond (ECL) (Amersham, Arlington Heights, IL) durante toda la noche en Tris 0,19 M, glicina 0,025 M, tampón de metanol al 20 %. Después de esto, se bloquearon las membranas en PBS, Tween al 0,1 % con leche al 10 % durante 1 h. El AcM anti-C3 RmC11H9 (Quigg *et al.*, anteriormente mencionado) que se había titulado previamente se añadió después a la transferencia en el mismo tampón con BSA al 1 %. Después de realizar el lavado, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) (preabsorbido contra IgG de ratón) durante 1 h, y después se lavó la transferencia y se reveló usando el sistema de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham).

La inhibición de la activación del complemento por CRlg-Fc en las partículas de zimosano se analizó después por citometría de flujo para detectar el C3 unido a la superficie (Figura 48A), o una alícuota del sobrenadante de la reacción de zimosano se analizó por transferencia de Western y se detectó usando un AcM anti-C3 (Figura 48B). Las posiciones de las cadenas de C3 y C3' intactas en B se muestran mediante flechas a la derecha. El carril de EDTA 10 mM representa el control negativo, y se muestran las dosis crecientes de CRlg-Fc en la parte superior de los carriles 2 a 7.

Ejemplo 15

CRlg inhibe la hemólisis de GRC por la ruta alternativa

Para la ruta alternativa: se lavaron glóbulos rojos de conejo (GRC) en tampón veronal (Bio Whittacker) que contenía gelatina al 0,1 % y se suspendieron hasta 1×10^9 células/ml en GVB. Se añadieron 10 μ l de la suspensión celular a 10 μ l de suero empobrecido en C1q que contenía los inhibidores. La mezcla se incubó durante 35 min a 37 °C en una sala cálida mientras que se agitaba. Se añadieron 200 μ l de GVB que contenía EDTA 10 mM, se centrifugaron las células a 2500 rpm durante 5 min y se leyeron alícuotas de 100 μ l a una de longitud de onda de 412 nm.

Para la ruta clásica, se incubaron eritrocitos de oveja opsonizados con IgM (E-IgM) en suero deficiente en fB. La metodología fue similar a la de las mediciones de la ruta alternativa.

Los resultados que se exponen en la Figura 49 muestran que el CRlg murino inhibe la hemólisis inducida por la ruta alternativa pero no afecta a la hemólisis de la ruta clásica. Se obtuvieron resultados similares con el CRlg humano.

Ejemplo 16

CRlg inhibe selectivamente la ruta alternativa del complemento

Ensayos hemolíticos usando suero completo

La ruta alternativa del complemento se evaluó con eritrocitos (Er) de conejo, como describen Kostavasili *et al.* (J. Immunol. 158: 1763-71 (1997)). Brevemente, los Er (Colorado Serum, Denver, CO) se lavaron 3x en GVB y se resuspendieron a 1×10^9 /ml. Se añadieron 10 μ l de Er a 10 μ l de GVB/EGTA (EGTA 0,1 M/MgCl₂ 0,1 M), inhibidores, 10 μ l de suero humano empobrecido en Clq y se ajustó el volumen a 100 μ l con GVB después se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron 250 μ l de GVB/EDTA 10 mM para detener la reacción, y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 x g. La hemólisis se determinó mediante por absorbancia de 200 μ g del sobrenadante a 412 nm. El porcentaje de lisis se normalizó considerando el 100 % de lisis igual a la lisis que se produce en ausencia del inhibidor.

Para determinar el efecto de CRlg sobre la ruta clásica del complemento, se siguió un procedimiento similar, excepto que los Er se reemplazaron con E-IgM y el ensayo se realizó en suero humano deficiente en fB en GVB++.

Medición de la escisión de C3 mediada por la convertasa C3

El efecto de CRlg sobre la escisión de la fase fluida de C3 mediante la convertasa C3 (C3b.Bb) (de Kostavasili *et al.*, anteriormente mencionado) se examinó incubando 0,4 μ M de C3 purificado con huCRlg-largo, huCRlg-corto, muCRlg o factor H en GVB (20 μ l de volumen) a 37 °C durante 15 minutos. Después, se añadieron 0,4 μ M de factor B y 0,04 μ M de factor D en presencia de MgEGTA 50 mM, en un volumen total de 30 μ l para activar la ruta. Después de 30 minutos a 37 °C, se detuvo la mezcla de reacción con 30 μ l de tampón de muestra de Laemmli (BioRad) que contenía 2-ME, llevado a ebullición durante 3 minutos, y sometido a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 8 % (Invitrogen). Se visualizaron las proteínas tiñendo el gel con el colorante SimplyBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gel se escaneó para el análisis densitométrico, y se calculó el porcentaje de C3 escindido. Los controles se incubaron en GVBE (GVB con EDTA 10 mM) para inhibir la escisión.

El ensayo en placa de microtitulación para la ruta alternativa DAA se realizó tal como se ha descrito previamente (Krych-Goldberg *et al.* J. Biol. Chem. 274: 31160-8 (1999)). Las placas de microtitulación se recubrieron durante toda la noche con 5 μ g/ml de C3b (Advanced Research Technologies) en solución salina tamponada con fosfato. Se blanquearon las placas durante 2 horas a 37 °C con fosfato salino tamponado que contenía albúmina de suero bovino al 1 % y Tween 20 al 0,1 % y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con 10 ng de factor B, 1 ng de factor D y NiCl₂ 0,8 mM en tampón veronal 2,5 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 71 mM y Tween 20 al 0,05 %. Utilizando el mismo tampón, se realizaron incubaciones secuenciales de 1 hora con 0,01-1 μ g de CRlg-Fc, 0,129 μ g de anticuerpo de cabra anti-factor B humano y 100 μ g de una dilución 1:15.000 de anticuerpo anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Se reveló el color con O-fenilendiamina. En este ensayo, el DAF y el factor H se comportaron como se esperaba, como mediadores de actividad de aceleración de degradación, y la liberación de C3a se detectó usando el kit RIA des-Arg de Amersham Pharmacia Biotech.

Ensayo de convertasa C5

C3b se depositó en zimosano resuspendiendo 1×10^{10} partículas de zimosano en 0,2 ml de C3 a 10 mg/ml y añadiendo 5 μ g de tripsina, después de una incubación de 10 minutos a 22 °C. La deposición de C3b por tripsina se repitió y las células se lavaron seis veces con 5 ml de GVB. Las partículas de zimosano se resuspendieron en 100 μ l de GVB y se mezclaron con 50 μ l de GVB que contenía los factores B (35 μ g) y D (0,5 μ g) y 50 μ l de NiCl₂ 10 mM. Después de 5 minutos de incubación a 22 °C, se añadieron 5 μ l de EDTA 0,2 M. El C3b unido se amplificó añadiendo 50 μ l de C3 (500 μ g) e incubando las células durante 30 minutos a 22 °C. Las partículas de zimosano que portaban C3b se lavaron y se repitió el procedimiento de amplificación hasta que se obtuvieran los números deseados de C3b/zimosano.

Debido a que la formación de la convertasa C5 duraba menos de un minuto, se formó la enzima en la misma mezcla de reacción en la que se realizaron los ensayos. Las velocidades enzimáticas se determinaron en condiciones saturantes de factores B y D, y C6, en tubos de microcentrífuga recubiertos de silicona de 0,5 ml tal como se describe anteriormente. Las mezclas de ensayo que contenían concentraciones variables de C5 (preincubadas durante 20 minutos a 37 °C para eliminar el fondo de actividad similar a C5b,6 generado por congelación/descongelación), factor B (1,2 μ g, 516 nM), factor D (0,1 μ g, 167 nM), C6 (2,5 μ g, 833 nM), y NiCl₂ 0,5 mM. La reacción comenzó con la adición de ZimC3b, ESC3b o ERC3b. Dependiendo de la densidad de C3b por célula, la concentración de células se ajustó de modo que se tuvieran 9-35 ng de C3b unido en un volumen final de 25 μ g de GVB dando como resultado 2-8 nM de concentración enzimática. Después de 15 minutos de incubación a 37 °C, la escisión adicional de C5 se impidió transfiriendo los tubos de ensayo a un baño con hielo y añadiendo GVBE enfriado en hielo. Las mezclas del ensayo diluidas apropiadamente se titularon inmediatamente para la formación de C5b,6 mediante ensayos hemolíticos usando CE. El C5b,6 se cuantificó usando curvas patrón generadas con C5b,6 purificado. Los controles establecieron que la temperatura fría y la dilución fueron suficientes para reducir la escisión de C5 durante las etapas posteriores a niveles indetectables. La lisis de los eritrocitos de

conejo (EC) o de los eritrocitos de oveja (EO) mostró contribuir en <2 % a los títulos de C5b,6 usando la lisis de CE como criterio de valoración final.

C5b,6 se midió hemolíticamente usando la sensibilidad de CE a la lisis hemolítica mediante el C5b-9 humano. Para una alícuota (25 µl) de la muestra diluida de los ensayos de la convertasa C5 se añadió una mezcla de $1,2 \times 10^7$ CE y 5 µl de suero humano normal (SHN) agrupado como una fuente de proteínas del complemento C7-C9 en un volumen final de 225 µl de GVBE. Las mezclas de reacción se incubaron durante 10 minutos a 37 °C después de los cuales las células no lisadas se eliminaron por centrifugación durante 1 minuto a $10.000 \times g$. La cantidad de hemoglobina liberada se cuantificó espectrofotométricamente a 414 nm. Se midió 100% de la lisis como CE lisadas en Nonidet P-40 al 2 %. Los controles que contenían C5 y C6 pero no convertasa C5, se restaron como el fondo. Los controles que contenían convertasa C5 pero no C5 o C6 purificadas demostraron que no se formó una cantidad significativa de C5b,6 del SHN usado como una fuente de C7-9 durante la lisis de las CE.

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 49(A)-(E).

La Figura 49(A) muestra que CRlg inhibe la hemólisis de eritrocitos de conejo en suero deficiente en C1q (ruta alternativa) pero no de los eritrocitos de oveja opsonizados con IgM en suero deficiente en fB (ruta clásica) indicando que CRlg inhibe selectivamente la ruta alternativa del complemento.

Tal como se muestra en la Figura 49(B), CRlg inhibe la actividad de la convertasa de C3 de la fase fluida. El gel muestra inhibición de la escisión de la cadena alfa de 115 kDa de C3 con aumento de la concentración de CRlg humano-DEC (10-100 nM).

Las Figuras 49(C) y (D) muestran que CRlg no actúa como un cofactor de la escisión de C3 mediada por el cofactor I ni como un acelerador de degradación de la convertasa C3.

Los datos que se exponen en la Figura 49(E) muestran que CRlg inhibe la ruta alternativa de la convertasa C5 formada en partículas de zimosano.

Ejemplo 17

CRlg se expresa en un subconjunto de macrófagos tisulares

Se generaron anticuerpos monoclonales específicos de CRlg humano y de ratón y se utilizaron para definir la expresión de CRlg, tal como se describe en el Ejemplo 3. Aunque CRlg estaba ausente en monocitos C14+ de sangre periférica, se detectó fácilmente en macrófagos derivados de monocitos por citometría de flujo (Figura 50B). huCRlg estaba ausente en células T $CD4^+$ y $CD8^+$, células B $CD19^+$, células NK $CD56^+$, granulocitos $CD15^+$ de sangre periférica (Figura 51A). De modo similar al huCRlg, muCRlg estaba ausente en los leucocitos de sangre periférica y esplénicos, incluyendo células mieloides $CD11b^+$, pero se detectaba en células de Kupffer hepáticas (CK, Figura 50B). La expresión de las proteína huCRlg(L) y (S) se confirmó a 55 y 48 K como proteínas Mr en monocitos diferenciados en macrófagos (Figura 50C). De modo similar el CRlg de ratón se detectó a 48 K como una glucoproteína Mr en macrófagos peritoneales (MP). MuCRlg tiene un sitio de N-glucosilación predicho y está glucosilado, representando un desplazamiento de movilidad en un gel de ~5 kDa (resultados no mostrados).

Como la expresión del ARNm de CRlg se detectó altamente en hígado, la expresión de CRlg en hígado se analizó adicionalmente por inmunohistoquímica. CRlg se expresó en CK $CD68^+$ en hígado humano y de ratón pero también se detectó en macrófagos de la glándula adrenal, placenta, sinovio, intestino y peritoneo (datos no mostrados). CRlg estaba ausente en macrófagos esplénicos humanos, en células de Langerhan, en células microgliales y en macrófagos derivados de médula ósea, así como en una variedad de líneas celulares de macrófagos de ser humano y de ratón (THP-1, RAW275, PU1.1, J774; resultados no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que CRlg se expresa altamente en una población de macrófagos residentes en diversos tejidos.

Ejemplo 18

CRlg se une a C3b e iC3b

Materiales y Métodos

Proteínas del complemento

El C3 humano y de ratón se aisló de acuerdo con el método de Hammer *et al.* (J. Biol. Chem. 256(8): 3995-4006 (1981)) con una columna de Proteína A adicional para eliminar las IgG contaminantes. Para obtener hC3b, hC3 se incubó con Cvf, hfB, ug, hfD en una relación molar de 10:10:1 a 37 °C durante una hora en presencia de MgCl₂ 10 mM. El fragmento hC3b se aisló posteriormente mediante un intercambiador aniónico fuerte monoQ 5/50 (Amersham

Biosciences, Piscataway, NY) y una columna de filtración en gel Superdex S-200 10/300 GL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para dar una pureza de >95% basada en el gel teñido con azul de Coomassie. Para generar dímeros de C3b, el C3b preparado como se ha indicado anteriormente se hizo reaccionar durante 3 días a 4 °C en PBS a pH 7,0 con bismaleidohexano (Pierce) en metanol en una relación molar de 2.2:1. Se generó la reticulación a través del grupo sulfhidrilo libre rompiendo el enlace tioéster. Con este procedimiento, el rendimiento fue superior al 50 %. Los dímeros se purificaron mediante una columna de filtración en gel Superdex S-200 10/300 GL (Amersham Biosciences, Piscataway, NY). Los dímeros tuvieron una pureza del 95 % basada en el gel teñido con Azul de Coomassie. El C3 hidrolizado se produjo con una adición de metilamina 2 M a un pH de 7,0 a C3 en PBS con EDTA 10 mM para dar una concentración final de 50 mM en el volumen de reacción. La reacción se procesó durante 4 horas a 37 °C, después de dicho tiempo se purificó sobre una columna de filtración en gel Superdex S-200 10/300 GL (Amersham Biosciences, Piscataway, NY), se purificaron iC3b y C3c (Advanced Research Technologies) sobre una columna de filtración en gel Superdex S-200 10/300 GL para separar los monómeros de los dímeros. El C3d, los Factores B, D y P, los componentes C1-9 del complemento, los eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpo y el factor de veneno de cobra se obtuvieron en Advanced Research Technologies (San Diego, CA).

Resultados

La expresión de CRlg en una población de células altamente fagocíticas, incitó a los inventores a explorar si CRlg estaba implicado en la unión de partículas opsonizadas. Se ha demostrado que el complemento y los receptores de Fc actúan como mediadores en la fagocitosis (revisado por Aderem y Underhill, Annu. Rev. Immunol. 17: 593-623 (1999), Underhill y Ozinsky, Annu Rev. Immunol. 20: 825-852 (2002)). Con el fin de determinar si CRlg se une al C3 del complemento, se analizaron eritrocitos de oveja recubiertos bien con IgG de conejo (E-IgG) o con IgM de ratón (E-IgM) para determinar su capacidad de formar rosetas con una línea de células T Jurkat que expresaba CRlgL en presencia de suero humano deficiente en C3 o C5. Las células Jurkat que expresaban CRlg(L) pero no las de control, formaron rosetas con E-IgM en presencia (C3+), pero no en ausencia (C3-) de C3 (Figura 52A), no parecía que CRlg estuviera implicado en la unión mediada por el receptor de Fc dado que los Es opsonizados con IgG no formaron rosetas con las células Jurkat que expresaban CRlg (resultados no mostrados).

Para ensayar si CRlg podía unirse directamente a los componentes del complemento en las superficies celulares, se generó una forma soluble de CRlg humano en la cual el DEC de CRlg se fusionó con la parte Fc de la IgG1 humana. La proteína de fusión huCRlg-largo-Fc, pero no la control-Fc, se unió a E-IgM opsonizadas en presencia, pero no en ausencia, de C3 (Figura 52B). La unión se restableció cuando se reconstituyó suero deficiente en C3 con C3 humano purificado. El dominio de Ig de tipo V fue suficiente para la unión dado que tanto huCRlg(S)-Fc como muCRlg-Fc fueron capaces de unirse a E-IgM (resultados no mostrados).

Como un resultado de la activación del complemento que incluye una cascada de reacciones enzimáticas, C3 se escinde en sus múltiples productos de degradación C3b, iC3b, C3c, C3dg y C3d, cada uno de los cuales puede servir como un compañero de unión para CRlg. Usando una placa ELISA de unión, huCRlg(L) y huCRlg(S)-Fc, pero no control-Fc demostraron unión saturable a C3b e iC3b (Figura 52C), pero no a C3, C3a, C3c o C3d (resultados no mostrados). Se observó una unión similar para huCRlgL-DEC, que carecía de la parte Fc, y muCRlg-Fc, y la unión a iC3b fue mayor que a C3b (resultados no mostrados). A la inversa, el C3b soluble también se unió a la placa recubierta con huCRlg(L)-Fc y compitió para el huCRlg(L)-DEC (resultados no mostrados). Por lo tanto, CRlg puede unirse a C3b e iC3b en solución o cuando C3b e iC3b están unidos a un sustrato. Dado que C3b está presente como una forma multimérica cuando se deposita en las superficies celulares, la unión de CRlg se evaluó adicionalmente para dímeros de C3b (C3b2) ensamblados artificialmente. El C3b2 se unió a huCRlg (L) con una Kd de 131 nM (Figura 52D) y a huCRlg(S) con una Kd de 44 nM, medido por resonancia de plasmón superficial (Figura 52D).

Para complementar estos estudios bioquímicos, se evaluó la especificidad de unión de CRlg de la superficie celular para productos derivados de C3. Una forma dimérica de C3b2 marcada A488 se unió a la superficie de células THP-1 CRlg+, pero no CRlg- (Figura 52E). La unión fue específica dado que compitió por la adición de C3b2, monómero C3b, soluble no marcado, y huCRlg(L)-DEC pero no por el C3 nativo. Además de la unión a fragmentos solubles del complemento, muCRlg expresado en la superficie de una línea celular CHO también se unió a diversas partículas opsonizadas en suero C3 suficiente, pero no en C3 deficiente (Figura 51B). En conjunto, estos estudios demuestran que CRlg expresado en la superficie celular así como el CRlg soluble (CRlg-FC) es un receptor para iC3b e C3b.

Ejemplo 19

La expresión de CRlg en células de Kupffer es necesaria para que se produzca la unión de fragmentos de C3 solubles o unidos a partículas

Materiales y métodos

1. Generación de ratones CRlg genosuprimidos (knock out (ko))

Todos los animales se mantuvieron en condiciones Estériles Libres de Patógenos y los experimentos realizados con animales fueron aprobados por el comité de uso y cuidado institucional de animales de Genentech. Se generaron células madre embrionarias CRlg ko por electroporación de un vector diana linealizado reemplazando el exón 1 por un gen resistente a neomicina (Figura 53A) en células madre embrionarias (ME) C2B6. Los clones resistentes a neomicina se seleccionaron, y la recombinación homóloga se confirmó por transferencia de Southern. Siete de 100 clones explorados fueron positivos para la recombinación homóloga. Dos clones diana se inyectaron en blastocistos C57VL/6 y se transfirieron a madres adoptivas pseudogestantes, y los ratones macho quiméricos resultantes se cruzaron con hembras C57BL/6 para obtener ratones +/- . La transmisión de la línea germinal se verificó para las 2ES clonadas por análisis de transferencia de Southern o por el ADN de la cola de la descendencia F1 (Figura 42B). El entrecruzamiento de ratones +/- se realizó para generar ratones CRlg -/-. Los fenotipos de los dos clones fueron idénticos. Para la genotipificación rutinaria mediante un método por PCR, se usaron un cebador común en sentido 5'-CCACTGGTCCCAGAGAAAGT-3' (SEC ID N°: 22), y un cebador antisentido específico de tipo silvestre (5'-CACTATTAGGTGGCCCAGGA-3') (SEC ID N°: 23) y específico knock out (5'-GGGAGGATTGGGAAGACAAT-3') (SEC ID N°: 24), amplificando un fragmento de 306 pb del alelo de tipo silvestre y un fragmento de 406 pb para el alelo mutante. La generación de ratones C3 ko se ha descrito anteriormente (Naughton *et al.*, Immunol. 156: 3051-3056 (1996). Para generar ratones CRlg/C3 doble knock out, se cruzaron ratones C3 ko en un fondo mixto de s129/B6 (F2) con ratones CRlg ko. Las hembras heterocigotas de F1 para ambos alelos se cruzaron posteriormente con machos heterocigotos C3, hemocigotos para el alelo CRlg. La descendencia de este emparejamiento se usó en los estudios. Los ratones C57B6 usados para el análisis de la expresión de CRlg por citometría de flujo se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor).

2. Transferencia de western y desglucosilación

Se lisaron macrófagos humanos y murinos en PBS que contenía SDS al 1 %, Triton X-100 al 0,1 % y un coctel inhibidor de proteasas (Boehringer). Después de centrifugar a 10.000 g, la fracción soluble se procesó en un gel de SDS y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. La proteína CRlg se visualizó usando anticuerpos anti CRlg y anticuerpos secundarios conjugados con HRPO seguido de detección de la quimioluminiscencia del anticuerpo unido mediante ECL (Amersham). Para determinar el estado de glucosilación de CRlg, las células que expresaban CRlg-gD se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-gD, se trataron con PNGasa, O-glucosidasa y neuraminidasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biolabs, NE) y se sometieron a análisis de transferencia de Western usando anticuerpos anti-gD marcados con biotina.

Resultados

Para estudiar la función biológica de CRlg, se generaron ratones con una mutación nula en el gen de CRlg mediante recombinación homóloga tal como se describe anteriormente y como se muestra en la Figura 42A. La delección se confirmó por transferencia de Southern (Figura 53B), transferencia de Western de lisados celulares de exudados peritoneales (Figura 54A) y citometría de flujo (Figura 54B). Nacieron ratones con las relaciones Mendelianas esperadas y no mostraron anomalías fenotípicas ni histopatológicas globales. Los números absolutos de células inmunitarias en diferentes compartimentos linfoides fueron similares en sangre, bazo y ganglios linfáticos de los animales de ts y ko (Figura 53C). Además, no se observaron diferencias en el número de CK F4/80+ y en los macrófagos del corazón cuando se analizaron por citometría de flujo e inmunohistoquímica, respectivamente (resultados no mostrados). En las CK los niveles de expresión de otras proteínas de unión al complemento, incluyendo las cadenas α y β del CR3 y el gen y relacionado con el receptor del complemento (Crry) no estaban alterados (Figura 54C). De modo similar, la expresión baja o indetectable de CR1, CR2 o CD11c, la cadena beta de CR4, fueron comparables entre las CK de ts o ko (Figura 53D).

A continuación se ensayó la capacidad de unión de las CK CRlg de ts y CRlg ko de los productos de degradación de C3. Los fragmentos de C3 (C3b, C3b2 e iC3b) se depositaron fácilmente en la superficie de las CK CRlg de ts (Figura 54B). Por el contrario, no se detectó unión de C3b, C3b2, iC3b ni iC3b2 en las CK CRlg ko. Se detectó escasa unión, o ninguna, de C3 y C3c con las CK de ts o ko (Figura 53E).

Para ampliar el análisis de la unión de los fragmentos solubles de C3 a la unión de los fragmentos de C3 unidos a las superficies celulares, se examinó el papel de CRlg sobre las CK con respecto a la unión de eritrocitos recubiertos con IgM opsonizados con C3. Las CK CRlg ko demostraron una reducción de ~60 % en la formación de rosetas con E-IgM cuando se compararon con las CK CRlg de ts (Figura 54D). CR3 tuvo una menor contribución con respecto a la actividad de unión total ya que se observó una reducción adicional (<20 %) en la formación de rosetas con la adición del anticuerpo bloqueante para CR3. Por lo tanto, la expresión de CRlg es necesaria para que se produzca la unión de los productos de degradación de C3 y las partículas opsonizadas por C3 a células de Kupffer.

Ejemplo 20

CRlg se internaliza y se expresa en endosomas de reciclaje

Como la unión de las partículas opsonizadas con C3 a sus receptores puede desencadenar su endocitosis posterior (Fearon *et al.*, J. Exp. Med. 153: 1615-1628 (1981); Sengelov, Crit Rev. Immunol. 15: 107-131 (1995)), se usaron

anticuerpos policlonales que desactivan al fluorocromo Alexa488 (Austin *et al.*, Mol. Biol. Cell 15: 5268-5282 (2004)) para analizar si CRlg y C3b se internalizan en las CK. Se preincubaron AcM anti CRlg conjugados con A488 con CK a 4 °C. La adición de anticuerpos anti-A488 a 4 °C suprimió la fluorescencia de los anticuerpos anti CRlg unidos a la superficie, como se muestra en la Figura 47A, panel 1. Cuando los AcM anti-CRlg conjugados con A488 se incubaron con CK a 37 °C durante 30 minutos después de incubación con anticuerpos anti-A488, la fluorescencia no se suprimió (Figura 55A, panel 4) indicando que los anticuerpos anti CRlg se internalizaban después de transferir las células de 4 °C a 37 °C y por lo tanto no eran accesibles a los anticuerpos anti-A488 desactivados. Se descubrió un resultado similar para C3b (Figura 55A, paneles 3 y 6). La internalización de anticuerpos anti-CRlg no fue dependiente de la presencia de C3 dado que la captación del anticuerpo se produjo en CK aisladas de ratones C3 ko (Figura 55A, paneles 2 y 5) y en ausencia de suero (resultados no mostrados). La inmunohistoquímica confirmó adicionalmente la presencia de anticuerpos anti CRlg y C3b en el citoplasma de CK de ratones CRlg de ts, pero no en los ko (Figura 55B). A lo largo del tiempo, cuando las CK recubiertas con anticuerpos anti CRlg conjugados con A488 se incubaron en presencia de anticuerpos anti-A488 extracelulares, se observó un descenso de la fluorescencia a lo largo del tiempo y este sugiere que los anticuerpos anti-CRlg se reciclan nuevamente en la superficie celular (Figura 55C). La evolución de reciclaje fue nuevamente independiente de C3 dado que la cinética de la desactivación fue similar en presencia y en ausencia de C3 (resultados no mostrados). Por el contrario, los anticuerpos contra la proteína lisosomal Lamp1 permanecieron intracelulares y no disminuyeron con el tiempo. Estos resultados indican que CRlg actúa como un receptor para C3b localizado en un conjunto de membranas de reciclaje constitutivas.

Para determinar adicionalmente los compartimentos subcelulares en los que se recicla CRlg, se visualizaron macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM) usando microscopía de deconvolución que usaba transferrina como marcador para endosomas de reciclaje y Lamp1 como marcador para lisosomas. Los MDM cultivados durante 7 días expresan CRlg en el 60 % de las células que muestran unión saturable de C3b (Figura 55A) que puede competir con el dominio extracelular de huCRlg(L) (resultados no mostrados). Los macrófagos recubiertos con anticuerpo anti-CRlg a 4 °C demuestran expresión focal de CRlg en las extensiones filopodiales ricas en F-actina (cabezas de flecha, Figura 56A, paneles 1-3). Además, el anticuerpo de CRlg se colocó con C3b en la superficie celular (resultados no mostrados). La transferencia de células de 4 °C a 37 °C seguido de incubación durante 10 minutos a 37 °C (Figura 56B) dio como resultado una internalización rápida del anticuerpo de CRlg y C3b en un compartimento endosomal transferrina⁺ localizado en la periferia de la célula (Figura 56B, paneles de 1-4, flechas) y bordeando el compartimento Lamp1⁺ (flechas Figura 57D, panel 1-4). CRlg permaneció localizado dentro del compartimento endosomal y no se degradó en el lisosoma con tiempos de búsqueda prolongados de hasta 24 horas (resultados no mostrados). La incubación de los macrófagos con anticuerpos anti-CRlg no influyó en la distribución de CRlg dado que el anticuerpo de CRlg internalizado se solapó completamente con el conjunto total de CRlg detectado después de la fijación con un anticuerpo policlonal (Figura 57C, paneles 1-3) y fue independiente de la presencia de C3 en el medio (Figura 57C, panel 4). En conjunto, estos resultados indican que CRlg está presente en endosomas de reciclaje y tempranos y que la internalización de CRlg tiene lugar en ausencia de ligando o de anticuerpo de entrecruzamiento.

Dado que la mayor parte de C3b e iC3b se depositó en partículas expuestas a suero (Brown, Curr. Opin. Immunol. 3: 76-82 (1991)), a continuación se exploró la localización de endosomas positivos a CRlg en macrófagos durante la fagocitosis de partículas opsonizadas con C3. Después del encuentro con glóbulos rojos de oveja opsonizados con iC3b (E-IgM), CRlg se redistribuyó rápidamente (10 minutos) de las vesículas positivas a transferrinas a los primeros fagosomas visibles como un anillo alrededor de los eritrocitos envueltos (Figura 56C, paneles 1 y 4, flechas). Dos horas después de la incubación de los macrófagos con partículas opsonizadas con C3, los fagosomas habían madurado tal como se muestra por su translocación dentro del compartimento liposomal (Figura 56C, paneles de 5-8). CRlg se expresaba a altos niveles en las membranas fagosómicas que circunda las partículas opsonizadas con C3 (Figura 56C, paneles 5 y 8, flechas) y en la mayor parte de los macrófagos ya no estuvieron presentes dentro del compartimento endosomal transferrina⁺. Mientras que CRlg seguía presente en un subconjunto de fagosomas en el compartimento lisosomal, su expresión no se solapaba con la de LAMP-1 (Figura 56C, paneles 7 y 8, cabezas de flechas). La ausencia de CRlg en las membranas LAMP-1⁺ no fue probablemente el resultado de la degradación lisosomal de CRlg dado que los inhibidores de proteasa estuvieron continuamente presentes durante la incubación. En algunos de los macrófagos que habían ingerido las E-IgM pero que carecían de fagosomas CRlg⁺, el CRlg⁺ se colocó con el compartimento transferrina⁺ (flecha gruesa, Figura 56C5, paneles 5 y 8, flechas finas) lo que sugiere que CRlg⁺ regresa al compartimento de reciclaje después de la transferencia de las E-IgM al compartimento lisosomal.

Considerados en conjunto, estos resultados indican que CRlg se acumula desde los endosomas a sitios de ingestión de partículas y participa en las fases iniciales de la formación del Fagosoma, pero sale del fagosoma después de la fusión del fagosoma con el lisosoma para volver al compartimento endosomal.

Ejemplo 21

Los ratones que carecen de CRlg son susceptibles a infección por *Listeria monocytogenes*

Materiales y métodos

1. Microorganismos, infección de ratones y evaluación del crecimiento de Listeria por determinación del recuento de las UFC

5 En todos los experimentos se usó la bacteria *L. monocytogenes* (LM) virulenta (ATCC cepa 43251). La virulencia de la bacteria se mantuvo mediante pases en serie en ratones BALB/c. Se obtuvieron aislados recientes de bazo infectados, que crecieron en infusión de cerebro y corazón (líquido) o en placas con infusión de cerebro corazón (Difco Laboratories, Detroit, MI). Las bacterias se lavaron varias veces, se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril, y después se conservaron en pequeñas alícuotas a -80 °C en PBS que
10 contenía glicerol al 40 %. Los ratones recibieron por vía intravenosa, en la vena de la cola, un inóculo de *L. monocytogenes* a diversas dosis. Para la observación del crecimiento bacteriano en los diversos órganos, se inyectaron por vía intravenosa 1×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Listeria*, una dosis no letal bien a ratones CRlg ko o a ratones CRlg de ts. El número de bacterias viables en el inóculo, homogeneizados del hígado y bazo, y las células infectadas, se determinó sembrando en placas de agar con infusión de cerebro corazón (Difco
15 Laboratories) diluciones en serie con factor 10. Después de incubar durante 24 horas a 27 °C se contaron los números de UFC.

2. Determinación de la captación de Listeria con A488 en células de Kupffer

20 La bacteria *L. monocytogenes* viva se marcó con un kit de marcaje de A-488 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Oregón). El número de bacterias *Listeria* vivas después del procedimiento de marcaje se evaluó por recuento de colonias. A ratones CRlg de ts o ko para CRlg se les inyectó, por vía intravenosa, 10 millones de UFC de LM. Una hora después, se perfundieron los hígados y se aislaron las células de Kupffer de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra F4/80 marcado
25 con PE, y las células positivas se aislaron usando perlas anti PE (Miletnyi) seguido de clasificación con un citómetro de flujo MoFlo (Dako-Cytomation, Ft. Collins, CO). Las células F4/80 positivas se recogieron en cubreobjetos y se calculó el número de bacterias internalizadas marcadas usando microscopía óptica y confocal. Se contó el número de bacterias por célula en 400 células de 4 campos diferentes por cubreobjetos. El índice fagocítico se calculó multiplicando el número medio de bacterias por célula por el porcentaje de células de Kupffer que contenían al
30 menos una bacteria. El resultado muestra la media y las desviaciones típicas del índice fagocítico obtenido de cuatro animales diferentes.

Resultados

35 Basándose en la unión de CRlg a partículas opsonizadas con C3b/iC3b, para explorar un papel de CRlg en la fagocitosis de partículas opsonizadas con el complemento *in vivo*, ratones CRlg de ts y KO para se infectaron con diversas dosis de *Listeria monocytogenes* (LM), una bacteria facultativa gram positiva que, cuando se expone a suero, activa la ruta alternativa del complemento que deposita predominantemente C3b e iC3b en la superficie bacteriana (Croize *et al.*, *Infec Immunol.* 61: 5134-5139 (1993)). Los ratones CRlg KO fueron significativamente más
40 susceptibles a la infección por LM, como se muestra por una mortalidad aumentada (Figura 58A). Por otro lado, el tratamiento con la proteína de fusión CRlg-Ig aumentó la susceptibilidad de los ratones CRlg ts, pero no la de los ratones CRlg ko (Figura 62).

45 En línea con un papel de CRlg en la unión y en la fagocitosis de partículas opsonizadas por C3 del complemento, los ratones CRlg ko tuvieron una eliminación reducida de LM de la sangre que dio como resultado un aumento de la carga de LM en bazo y pulmón (Figura 58B). También hubo una disminución de la carga de LM en hígado y corazón de ratones infectados lo que probablemente refleja la presencia de macrófagos que expresan CRlg en estos tejidos (Figura 58B). Las respuestas a la inflamación fueron elevadas en ratones CRlg ko reflejadas por niveles aumentados en suero de TNF- γ , TNF- α e IL-6 (Figura 58C). En coherencia con la necesidad de CRlg para la eliminación de
50 partículas opsonizadas con C3, las CK que expresan CRlg ko demostraron unión y fagocitosis significativamente reducida de LM en comparación con las CK que expresan CRlg de ts (Figura 58D). Finalmente, el aumento de la carga de *Listeria* detectado en la sangre de ratones CRlg ko fue dependiente de C3 ya que infección de ratones C3 ko anulaba la diferencia en el título bacteriano en ratones CRlg ko frente al ts (Figura 58E). De modo interesante, los niveles de bacterias en circulación fueron significativamente menores en ratones C3 ko en comparación con ratones
55 C3 suficientes, y probablemente esto refleja el aumento de la implicación de mecanismos independientes de C3 responsables de la eliminación de *Listeria* en ratones C3 ko. Sin embargo, la eliminación rápida en ausencia de C3, no da como resultado una eliminación eficaz de patógenos a largo plazo dado que los ratones deficientes en C3 mueren al cabo de 2 días después de la infección con bacterias gram positivas (Cunnion *et al.*, *J Lab. Clin. Med.* 143: 358-365 (2004)). Estos resultados indican contundentemente que el CRlg expresado en células de Kupffer hepáticas juega un papel crítico en la eliminación rápida de la circulación del patógeno opsonizado con C3 del
60 complemento.

Ejemplo 22

65 Inhibición de la hemólisis inmunitaria mediada por el complemento con moléculas muCRlg

Está bien establecido que los eritrocitos de conejo activan específicamente la ruta alternativa del complemento, con una lisis resultante de células por el complejo C5b-9 (Polhill, *et al.*, J. Immunol. 121(1), 363-370 (1978)). En particular, los eritrocitos de conejo inician la cascada alternativa del complemento, y la formación resultante de MAC causa la lisis de estas células. Si un compuesto de ensayo es capaz de inhibir la ruta alternativa, entonces la adición del reactivo a los eritrocitos de conejo bañados en suero (en este caso suero de mono *Cinomolgo* o suero humano empobrecido en C1q) debería impedir la lisis celular. Esto puede ensayarse controlando los cambios de absorbancia de luz a una longitud de onda 412 nm producidos por la liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados. En los experimentos con suero de mono *Cinomolgo*, se recogió sangre de la vena femoral de los monos *Cinomolgos*. No se usó anticoagulante. Se dejó coagular las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron y el suero se recogió y se conservó en un congelador ajustado para mantener la temperatura de -60 a -80 °C. Los glóbulos rojos de conejo (GRC) se lavaron tres veces en GVB ((tampón veronal 1x (Biowhittaker), gelatina al 0,1 %), y se resuspendieron a 1×10^9 /ml en GVB. Se añadieron GVB, hC1g (corto, largo o DEC largo), después de la adición de 10 µl de GVB+/EGTA (GVB, EGTA 0,1 M, MgCl₂ 0,1 M). Se añadieron 10 µl de suero de mono *Cinomolgo* o empobrecido en C1q (Quidel), seguido de la adición de 10 µl de GRC, y la mezcla se mezcló con golpecitos con el dedo. Después de incubar durante 45 min a 37 °C, en una sala cálida con agitación, se añadieron 250 µl de GVB/EDTA 10 mM, y la mezcla se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se usaron alícuotas de 250 µl y se leyeron a 412 nm. Los resultados mostrados en las Figuras 63 A y B (suero de *Cino*) y en las Figuras 64-66 (suero humano) demuestran que los compuestos C1g sometidos a ensayo inhiben el complemento.

hST-L: C1g-largo humano

hST-S: C1g-corto humano

hST-L DEC: DEC C1g-largo humano

hPIGR: receptor polimérico de inmunoglobulina humana

fH: factor del complemento H.

Ejemplo 23

Ensayo de proteínas de fusión C1g murino-Fc en un modelo de ratón de neovascularización coroidal

La neovascularización coroidal (NVC) puede inducirse experimentalmente por quemaduras láser en la retina. En el presente estudio, 40 ratones C57BL-6 (Charles River Laboratory) se dividieron en dos brazos de tratamiento.

Grupo 1 (control): inyección i.p. de gap120 mIgG1 12 mg/kg los días -1, 1, 3 y 5.

Grupo 2: inyección i.p. de C1g murino (mC1g) 12 mg/kg los días -1, 1, 3 y 5.

En cada brazo, se anestesió a los animales por inyección subcutánea (s.c.) de una mezcla de ketamina (25 mg/g) y xilacina (1,28 mg/g). Se dilataron las pupilas usando una sola gota de tropicamida al 1 %. Después se inmovilizó a los animales en un molde de plástico. Se usó un láser de diodo (tamaño de punto 100-µm) para generar tres puntos láser en el ojo alrededor del nervio óptico, usando un Láser de Diodo OcuLight GL (532 nm), una lámpara de hendidura Zeiss de 30 W y un micromanipulador. El ojo derecho se sometió a láser con 120 mW, 0,1 segundos y 100 µm de tamaño de punto. Una burbuja formada en el punto láser indica la rotura de la membrana de Brach.

Los puntos láser se evaluaron el día 7 después del tratamiento con láser, usando microscopia confocal. En este momento, los animales se anestesiaron con isoflurano, y a través del corazón se realizó una perfusión de 0,5 ml de PBS que contenía 50 mg/ml de dextrano marcado con fluoresceína (Sigma). Se extirparon los ojos y se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 10 %, las retinas se descartaron y el cáliz ocular restante se montó horizontalmente en un portaobjetos. El examen histopatológico incluyó tinción inmunohistoquímica de los montajes coroidales horizontales para visualizar los fragmentos del complemento y la elastina y realizar el análisis del tamaño del complejo NVC controlando la vasculatura teñida con dextrano-FITC en los ojos con microscopia confocal.

Los resultados se muestran en las Figuras 71 A y B, donde los orificios por quemadura del ojo derecho se puntúan en una escala de 0 a 3 y de 0 a 5, respectivamente.

Ejemplo 24

Ensayo de los DEC de C1g y de las proteínas de fusión C1g-Fc en monos *Cinomolgos* sometidos a daño retinal inducido por láser

En este estudio se utilizaron 24 monos *Cinomolgos*, macho o hembra, 12 machos y 12 hembras. La edad de los animales oscilaba entre 2 a 7 años y su peso entre 2 a 5 kg.

Tabla 2

Designación de Grupos y Niveles de Dosis

Grupo	Nº de Animales	Número de Animales a los que se realiza Necropsia ^a			Nivel de Dosis ^b (mg/kg/dosis)
		Fase de dosificación 2 Día 6	Fase de dosificación 1 Día 18	Fase de dosificación 1 Día 32	
1 (Control) ^c	12	3	3	6	0
2 (Tratado)	12	3	3	6	10

a La dosificación de los animales programados para sacrificar 2 días después del tratamiento con láser (Dosificación de fase 2) se inicia aproximadamente 2 semanas después de comenzar el estudio de la Fase de Dosificación 1.

b El volumen de la dosis es en ml/kg/dosis.

c El grupo 1 solo recibe vehículo.

5 La administración es por inyección intravenosa a través de la vena cefálica. Los animales reciben la dosis al menos una vez antes del tratamiento con láser, y tres veces semanalmente durante el resto del estudio. Las dosis se realizan en función del peso corporal más recientemente registrado, y están en el intervalo de 10 a 15 mg/kg.

10 El Día 4, la mácula de cada ojo de todos los animales se sometió a tratamiento láser mediante CORL con quemaduras láser verde de diodo 532 nm (OcuLight GL, IRIDEX Corp Inc, Mountain View, California) usando un sistema de suministro de lámpara de hendidura y una lente de contacto de fondo plano Kaufman-Wallow (Ocular Instruments Inc, Bellevue, Wash). El láser y el equipo de soporte se obtienen en CORL. Los animales se anestesian con ketamina y xilacina. Se localizan nueve áreas simétricamente en la mácula de cada ojo. Los parámetros del
15 láser incluyen un tamaño de punto de 75 micras y una duración de 0,1 segundos. La potencia usada se evalúa por la capacidad de producir una ampolla y una pequeña hemorragia. A menos que se observe hemorragia con el primer tratamiento láser, se coloca un segundo punto de láser adyacente al primero siguiendo el mismo procedimiento con láser (excepto que se ajustan los vatios). Para las áreas no adyacentes a la fovea la potencia inicial ajustada es de 500 mW; si se coloca un segundo punto, la potencia se ajusta a 650 mW. Para el área adyacente a la fovea las
20 potencias ajustadas son de 400 mW (inicial) y 550 mW (segunda). A criterio del cirujano retinal, los ajustes de la potencia pueden ajustarse en función de las observaciones en el momento del tratamiento con láser.

Exámenes oftalmológicos clínicos

25 Antes de iniciar el tratamiento, y los días 8, 15, 22 y 29, se realiza un examen clínico oftalmológico a cada animal. Se anestesió a los animales con ketamina, y se dilataron los ojos con un agente midriático. La parte adyacente y anterior de ambos ojos se examinó usando un biomicroscopio con lámpara de hendidura. Se examinó el fondo ocular de los dos ojos usando un oftalmoscopio indirecto. A criterio del oftalmólogo, los ojos pueden examinarse usando otra instrumentación adecuada y pueden tomarse fotografías.

Fotografías oculares

35 Se tomaron fotografías oculares (FO) una vez el día del tratamiento láser (post-láser), en la Fase de Dosificación 1 Días 10, 17, 24 y 31, y en la Fase de Dosificación 2 Día 6 (el día de la necropsia). Cuando se hace conjuntamente con la angiografía de fluoresceína durante la Fase de Dosificación 1, primero se toman las FO.

40 Los animales se anestesian con ketamina y se mantienen con el anestésico isoflurano cuando se hace conjuntamente con la angiografía de fluoresceína y se anestesian con ketamina y xilacina cuando se hace solo (es decir, después del tratamiento de láser). Los ojos se dilatan con un agente midriático. Se toman fotografías a color de cada ojo y se incluyen las anomalías de la retina y oculares pertinentes, fotografías estereoscópicas del polo posterior y fotografías no estereoscópicas de dos campos centrales-periféricos (temporal y nasal).

Angiografía con fluoresceína

45 La angiografía con fluoresceína se realiza una vez antes de iniciar el tratamiento de todos los animales y en la Fase de Dosificación los Días 10, 17, 24 y 31 (6, 13, 20 y 27 días postláser).

50 Antes de realizar la angiografía con fluoresceína los animales se someten a ayuno. Se anestesia a los animales con ketamina y se les mantiene con isoflurano, y los ojos se dilatan con un agente midriático. Los animales se entuban debido a la posibilidad de que vomiten tras la inyección de fluoresceína. Los animales reciben una inyección intravenosa de fluoresceína. Se toman las fotografías al comienzo y al final de la inyección de fluoresceína. Después de la inyección de fluoresceína, se toma una serie rápida de estereofotografías del polo posterior del ojo derecho seguido de pares estereoscópicos del polo posterior del ojo izquierdo antes de 1 minuto, y después en cada ojo a aproximadamente 1 a 2, y 5 minutos. Entre aproximadamente 2 y 5 minutos, se toman fotografías no

estereoscópicas de dos campos centrales-periféricos (temporal y nasal) de cada ojo. Si se observa filtración de fluoresceína en el momento del minuto 5, se toma un par de fotografías estereoscópicas aproximadamente a los 10 minutos.

- 5 La evaluación de los angiogramas de fluoresceína se realiza de acuerdo con el siguiente sistema de clasificación para confirmar el exceso de permeabilidad (filtración de fluoresceína) o cualquier otra anomalía.

<u>Grado de Lesión</u>	<u>Definición</u>
I	Sin hiperfluorescencia
II	Hiperfluorescencia sin filtración
III	Hiperfluorescencia precoz o filtración media-transitoria y tardía
IV	Hiperfluorescencia brillante precoz o filtración media-transitoria y tardía más allá de los bordes del área tratada

Depósito del material

- 10 El siguiente material se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Designación	Nº de Dep. de la ATCC	Fecha del Depósito
ADN45416-1251	209620	5 de febrero de 1998

- 15 Este depósito se realizó según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con la Finalidad del Procedimiento de Patentes y la Normativa estipulada en el mismo (Tratado de Budapest). Esto garantiza la conservación de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito estará disponible en la ATCC en los términos del Tratado de Budapest y estará sujeto a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo del depósito al público después de la expedición de la Patente de EE.UU. pertinente o después de su apertura a inspección pública de cualquier Solicitud de Patente de EE.UU. o extranjera, sea lo que sea lo que ocurra primero, y garantiza la disponibilidad de la descendencia a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas registradas de los EE.UU. para tener derecho a la misma de acuerdo con las normas 35 USC'122 y del Comisionado conforme a las mismas (incluyendo la 37 CFR § 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

- 20 El beneficiario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye al cultivar en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán puntualmente por otros de los mismos cuando se notifique. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para llevar a la práctica la invención infringiendo los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con esta ley de patentes.

- 30 La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para permitir que un experto en la materia lleve a la práctica la invención. El alcance de la presente invención no está limitado por las construcciones depositadas, dado que la realización depositada pretender ser solo una ilustración de determinados aspectos de la invención y cualquiera de las construcciones que sean funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material del presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se interpretará como una limitación del alcance de las reivindicaciones con respecto a las ilustraciones específicas que esta representa.

- 35 En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las que se muestran y se describen en el presente documento, serán obvias para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y se incluirán en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> GENENTECH, INC ASHKENAZI, AVI HELMY, KARIM YUSSEF FONG, SHERMAN GODDARD, AUDREY GURNEY, AUSTIN L. KATSCHKE JR., JAMES KATCHKE
10	VAN LOOKEREN, MENNO WOOD, WILLIAM I
	<120> Prevención y tratamiento de trastornos asociados al complemento
15	<130> 39766-0100CP4
	<140> A asignar <141> 10-10-2005
20	<150> US 11/159.919 <151> 22-06-2005
	<150> US 10/964.263 <151> 12-10-2004
25	<150> US 10/767.374 <151> 29-01-2004
	<150> US 10/767.904 <151> 29-01-2004
30	<150> US 09/953.499 <151> 14-09-2001
	<150> PCT/US03/31207 <151> 01-10-2003
	<150> US 10/633.008 <151> 31-07-2003
40	<150> US 10/265.542 <151> 03-10-2002
	<150> US 09/254.465 <151> 05-03-1999
	<150> US 09/380.138 <151> 25-08-1999
50	<150> PCT/US99/05028 <151> 08-03-1999
	<150> PCT/US98/24855 <151> 20-11-1998
55	<150> US 60/078.936 <151> 20-03-1998
	<160> 28
60	<170> FastSEQ para Windows versión 4.0
	<210> 1 <211> 2181 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>
65	

<400> 1

```

cccacgcgtc cgccacgcg tccgcccacg ggctccgcca cgcgtccggg ccaccagaag 60
tttgagcctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca gaagtagctc tggctgtgat 120
ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc 180
catcctggaa gtgccagaga gtgtaacagg accttggaag ggggatgtga atcttccctg 240
cacctatgac cccctgcaag gctacacca agtcttggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300
ctcagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatcc agcaggcaaa 360
gtaccagggc cgctgcatg tgagccacaa ggttccagga gatgtatccc tccaattgag 420
caccctggag atggatgacc ggagccacta cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga 480
tggcaaccaa gtcgtgagag ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc 540
caagcccaca gtgacaactg gcagcgggta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg ataagcaaca 660
gactaataac caggaaccca tcaaagtagc aaccttaagt accttactct tcaagcctgc 720
ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg cactgccaaag ggccagggtg gctctgagca 780
gcacagcgac attgtgaagt ttgtggtaaa agactcctca aagctactca agaccaagac 840
tgaggcacct acaacctga cataccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc caggaaagag 960
cctgcctgtc tttgccatca tcctcatcat ctcttctgtc tgtatgggtg tttttaccat 1020
ggcctatate atgctctgtc ggaagacatc ccaacaagag catgtctacg aagcagccag 1080
gtaagaaagt ctctcctctt ccatTTTTga ccccgccctt gccctcaatt ttgattactg 1140
gcaggaaatg tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200
agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgagggtgt tttggccctc 1260
tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt ccagaatccc tgggtggtag 1320
gatcctgata attaatggc aagaattgag gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc 1380
ccaagtccct tcttatgggt ggtgggctct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca 1440
acgactctgg agaaaccatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgtctc agtgatgagc 1500
caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga caggagtacc 1560
agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct ggacacagtt cctctggatt 1620
atgagtttct ggccactgag ggcaaaagtg tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat 1680
ctgctgacat aattgcctag tcagtccctg ccttctgcat ggccttcttc cctgtactct 1740
ctcttctctg atagcccaaa gtgtccgcct accaacactg gagccgctgg gagtcaactg 1800
ctttgccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat ttggctctgg 1860
gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc tctaaatacc agagggaaga 1920
tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg cctacagaca ctattcaact ttggcatctt 1980
gccaccagaa gacccgaggg aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag 2040
gatcatttct ctttcttcag ggccagacag ctitttaattg aaattgttat ttcacaggcc 2100
agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc tgggtgctcaa 2160
taaatatcta atcataacag c

```

5

<210> 2
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 1372
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

```

ccaactgcac ctcggttcta tcgataggag gctggaagaa aggacagaag tagctctggc 60
tgtgatgggg atcttactgg gcctgtctact cctggggcac ctaacagtgg acacttatgg 120
ccgtcccatc ctggaagtgc cagagagtgt aacaggacct tggaaagggg atgtgaatct 180
tccctgcacc tatgaccccc tgcaaggcta caccgaagtc ttggtgaagt ggctgggtaca 240
acgtggctca gacctgttca ccatctttct acgtgactct tctggagacc atatccagca 300
ggcaaagtac cagggccgcc tgcattgtgag ccacaagggt ccaggagatg tatccctcca 360
attgagcacc ctggagatgg atgaccggag ccactacacg tgtgaagtca cctggcagac 420
tcctgatggc aaccaagtgc tgagagataa gattactgag ctccgtgtcc agaaactctc 480
tgtctccaag cccacagtga caactggcag cgggttatggc ttcacggtgc cccaggggaat 540
gaggattagc cttcaatgcc aggcctcggg tctcctccc atcagttata tttggtataa 600
gcaacagact aataaccagg aacccatcaa agtagcaacc ctaagtacct tactcttcaa 660
gcctgcggtg atagccgact caggctccta tttctgcact gccaaagggc aggttggctc 720
tgagcagcac agcgacattg tgaagtgtgt ggtcaaagac tcctcaaagc tactcaagac 780
caagactgag gcacctacaa ccatgacata ccccttgaaa gcaacatcta cagtgaagca 840
gtcctgggac tggaccactg acatggatgg ctaccttgga gagaccagt ctgggcccagg 900
aaagagcctg cctgtctttg ccatcatcct catcatctcc ttgtgctgta tgggtggttt 960
tacctggcc tatatcatgc tctgtcggaa gacatcccaa caagagcatg tctacgaagc 1020
agccagggca catgccagag aggccaaacga ctctggagaa accatgaggg tggccatctt 1080
cgcaagtggc tgctccagtg atgagccaac ttcccagaat ctgggcaaca actactctga 1140
tgagccctgc ataggacagg agtaccagat catgcgccag atcaatggca actacgcccg 1200
cctgtctggc acagttcctc tggattatga gtttctggcc actgagggca aaagtgtctg 1260
ttaaaaatgc cccattaggc caggatctgc tgacataatc tagagtcgac ctgcagaagc 1320
ttggccgcca tggcccaact tgtttattgc agcttataat gggtacaaat aa 1372

```

<210> 4
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

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

```

Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 105 110
 Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
 130 135 140
 Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg
 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
 165 170 175
 Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
 195 200 205
 Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
 210 215 220
 Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
 245 250 255
 Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
 275 280 285
 Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
 290 295 300
 Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
 325 330 335
 Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln Asn
 340 345 350
 Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr Gln
 355 360 365
 Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
 370 375 380
 Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
 385 390 395

<210> 5
 <211> 1090
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

gtccaactgc acctcgggttc tatcgatagg aggctggaag aaaggacaga agtagctctg 60
 gctgtgatgg ggatcttact gggcctgcta ctcttggggc acctaacagt ggacacttat 120
 ggccgtccca tcctggaagt gccagagagt gtaacaggac cttggaaagg ggatgtgaat 180
 ctccctgca cctatgaccc cctgcaaggc tacaccaag tcttggtgaa gtggctggta 240
 caacgtggct cagaccctgt caccatcttt ctacgtgact cttctggaga ccatatccag 300
 caggcaaagt accagggccg cctgcatgtg agccacaagg ttccaggaga tgtatccctc 360
 caattgagca ccctggagat ggatgaccgg agccactaca cgtgtgaagt cacctggcag 420
 actcctgatg gcaaccaagt cgtgagagat aagattactg agctccgtgt ccagaaacac 480
 tcctcaaacg tactcaagac caagactgag gcacctacaa ccatgacata ccccttgaaa 540
 gcaacatcta cagtgaagca gtcctgggac tggaccactg acatggatgg ctaccttgga 600
 gagaccagtg ctgggccagg aaagagcctg cctgtctttg ccatcatcct catcatctcc 660
 ttgtgctgta tgggtggttt taccatggcc tatatcatgc tctgtcggaa gacatcccaa 720
 caagagcatg tctacgaagc agccagggca catgccagag aggccaacga ctctggagaa 780
 accatgaggg tggccatctt cgcaagtggc tgctccagtg atgagccaac ttcccgaaat 840
 ctgggcaaca actactctga tgagccctgc ataggacagg agtaccagat catcgcccag 900
 atcaatggca actacgcccg cctgctggac acagttcctc tggattatga gtttctggcc 960
 actgagggca aaagtgtctg ttaaaaatgc cccattaggg caggatctgc tgacataatc 1020
 tagagtgcac ctgcagaagc ttggccgcca tggcccaact tgtttattgc agcttataat 1080
 ggttacaata 1090

<210> 6
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

```

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

10 <210> 7
 <211> 1590
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 7

```

gtccaactgc accctcggttc tatcgattcg aattcggcca cactggccgg atcctctaga 60
gatccctcga cctcgaccca cgcgtccgag cagcaagagg atggaaggat gaatagaagt 120
agcttcaaat aggatggaga tctcatcagg cttgctgttc ctgggccacc taatagtgt 180
cacctatggc caccaccacc taaaaacacc tgagagtgtg acagggacct ggaaaggaga 240
tgtgaagatt cagtgcattc atgatccctc gagaggctac aggcaagttt tggtgaaatg 300
gctggtaaga cacggctctg actccgtcac catcttccta cgtgactcca ctggagacca 360
tatccagcag gcaaagtaca gaggcgcctt gaaagtgagc cacaagttc caggagatgt 420
gtccctccaa ataaatacc tgcagatgga tgacaggaat cactatacat gtgaggtcac 480
ctggcagact cctgatggaa accaagtaat aagagataag atcattgagc tccgtgttcg 540
gaaatataat ccacctagaa tcaatactga agcacctaca accctgcact cctctttgga 600
agcaacaact ataatgagtt caacctctga cttgaccact aatgggactg gaaaacttga 660
ggagaccatt gctggttcag ggaggaacct gccaatcttt gccataatct tcatcatctc 720
cctttgctgc atagtagctg tcaccatacc ttatatcttg ttccgctgca ggacattcca 780
acaagagtat gtctatggag tgagcagggt gtttgccagg aagacaagca actctgaaga 840
aaccacaagg gtgactacca tcgcaactga tgaaccagat tcccaggctc tgattagtga 900
ctactctgat gatccttgcc tcagccagga gtaccaaata accatcagat caacaatgtc 960

```

```

tattcctgcc tgctgaacac agtttccaga aactaagaag ttcttgctac tgaagaaaat 1020
aacatctgct aaaatgcccc tactaagtca aggtctactg gcgtaattac ctgttactta 1080
tttactactt gccttcaaca tagctttctc cctggcttcc tttcttctta gacaacctaa 1140
agtatctatc tagtctgcca attctggggc cattgagaaa tcctgggttt ggctaagaat 1200
atactacatg cacctcaaga aatctagctt ctgggcttca ccagaacaa ttttcttctc 1260
agggccttca caactcttct ccaaacagca gagaaattcc atagcagtag aggttcttta 1320
tcatgcctcc agacagcgtg agtctcagtc ctacaaactc agacaagcac atgggtctag 1380
gattactcct ctttctctag ggccagatga cttttaattg atattactat tgctacatta 1440
tgaatctaata gcacatgtat tcttttgttg ttaataaatg tttaatcatg acatcaaaaa 1500
aaaaaaaaaa aagggcggcc gcgactctag agtcgacctg cagtagggat aacagggtaa 1560
taagcttggc cgccatggcc caacttgttt 1590

```

<210> 8
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 8

Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu
1 5 10 15
Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr
20 25 30
Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly
35 40 45
Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser
50 55 60
Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
65 70 75 80
Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
85 90 95
Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg Asn His Tyr Thr
100 105 110
Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Ile Arg Asp
115 120 125
Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro Arg Ile Asn
130 135 140
Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu Ala Thr Thr Ile
145 150 155 160
Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr Gly Lys Leu Glu
165 170 175
Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile Phe Ala Ile Ile
180 185 190
Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr Ile Pro Tyr Ile
195 200 205
Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val Tyr Gly Val Ser
210 215 220
Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu Thr Thr Arg Val
225 230 235 240
Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala Leu Ile Ser Asp
245 250 255
Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln Ile Thr Ile Arg
260 265 270
Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys
275 280

<210> 9
<211> 1503
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

gcaggcaaag taccagggcc gcctgcatgt gagccacaag gttccaggag atgtatccct 60
ccaattgagc accctggaga tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca 120
gactcctgat ggcaaccaag tcgtgagaga taagattact gagctccgtg tccagaaact 180
ctctgtctcc aagccacacag tgacaactgg cagcggttat ggcttcacgg tgccccaggg 240
aatgaggatt agccttcaat gccagggttc ggggttctcc tccatcagt tatatttgg 300
ataagcaaca gactaataac caggggaaccc atcaaagtag caaccctaag taccttactic 360

```

ttcaagcctg cgggtgatagc cgactcaggg tcctatttct gcactgccaa gggccaggtt 420
ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag tttgtggtca aagactcctc aaagctactc 480
aagaccaaga ctgaggcacc tacaacccat acatacccct tgaaagcaac atctacagtg 540
aagcagtcct gggactggac cactgacatg gatggctacc ttggagagac cagtgtctgg 600
ccaggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atcctcatca tctccttggt ctgtatggtg 660
gtttttacca tggcctatat catgctctgt cggaagacat cccaacaaga gcatgtctac 720
gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc aacgactctg gagaaccat gaggggtggc 780
atcttcgcaa gtggctgctc cagtgtatgag ccaacttccc agaactctgg gcaacaacta 840
ctctgatgag ccctgcatag gacaggagta ccagatcatc gccagatca atggcaacta 900
cgcccgctg ctggacacag ttcctctgga ttatgagttt ctggccactg agggcaaaag 960
tgtctgttaa aaatgcccc ttagggcagg atctgtctgac ataattgcct agtcagtcct 1020
tgcttctgc atggccttct tccctgctac ctctcttctt ggatagccca aagtgtccgc 1080
ctaccaacac tggagccgct gggagtcact ggctttgccc tgggaatttg cagatgcatc 1140
tcaagtaagc cagctgctgg atttggctct gggcccttct agtatctctg ccgggggctt 1200
ctggtactcc tctctaaata ccagagggaa gatgcccata gcactaggac ttggtcatca 1260
tgccctacaga cactattcaa ctttggcatc ttgccaccag aagaccgag gggaggctca 1320
gctctgccag ctcagaggac cagctatatc caggatcatt tctctttctt cagggccaga 1380
cagcttttaa ttgaaattgt tatttcacag gccagggttc agttctgtct ctccactata 1440
agtctaattg tctgactctc tcctggtgct caataaatat ctaatcataa cagcaaaaaa 1500
aaa 1503

```

5 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 10
 tatccctcca attgagcacc ctgg 24

15 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 11
 gtcggaagac atccaacaa g 21

25 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 12
 cttcacaatg tcgctgtgct gctc 24

35 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

45 <400> 13
 agccaaatcc agcagctggc ttac 24

5	<210> 14 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda oligonucleotídica sintética	
10	<400> 14 tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat	50
15	<210> 15 <211> 7496 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15	

ttcgagctcg	cccgaacattg	attatttgact	agttattaat	agtaatacaat	tacgggggtca	60
ttagttcata	gccccatata	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgcct	120
ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	180
acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	240
ttggcagtac	atcaagtgtg	tcatatgcc	agtacgcccc	ctattgacgt	caatgacggg	300
aaatggcccc	cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	360
tacatctacg	tattagtcac	cgctattacc	atgggtgatg	ggttttggca	gtacatcaat	420
gggcgtggat	agcggtttga	ctcacgggga	tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	480
gggagtttgt	tttggcacca	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	540
ccattgacgc	aaatgggagg	taggcgtgtg	cgggtggagg	tctatataag	cagagctcgt	600
ttagtgaacc	gtcagatcgc	ctggagacgc	catccacgct	gttttgacct	ccatagaaga	660
caccgggacc	gatccagcct	ccgcggccgg	gaacgggtgc	ttggaacgcg	gattccccgt	720
gccaagagt	acgtaagtac	cgccatagag	gtctataggc	ccacccccct	ggcttggccc	780
accccccttg	cttcgttaga	acgcggctac	aattaatata	taaccttatg	tatcatatac	840
atacgattta	gggtgacact	tagaataaca	tccactttgc	ctttcacatc	cactttgcct	900
ttctctccac	aggtgtccac	tcccagggtc	aactgcacct	cggttctatc	gattaaacca	960
ccatggggat	cttactgggc	ctgctactcc	tggggcacct	aacagtggac	acttatggcc	1020
gtccccatcct	ggaagtggca	gagagtgtga	caggaccttg	gaaaggggat	gtgaatcttc	1080
cctgcacctg	tgacccccctg	caaggctaca	cccaagtctt	ggtgaaagtg	ctggtaacaac	1140
gtggctcaga	ccctgtcacc	atctttctac	gtgactcttc	tggagaccat	atccagcagg	1200
caaagtacca	gggcccgcctg	catgtgagcc	acaagggtcc	aggagatgta	tccctccaat	1260
tgagcaccct	ggagatggat	gaccggagcc	actacacgtg	tgaagtcacc	tggcagactc	1320
ctgatggcaa	ccaagtcgtg	agagataaga	ttactgagct	ccgtgtccag	aaactctctg	1380
tctccaagcc	cacagtgaac	actggcagcg	gttatggctt	cacgggtgcc	cagggaatga	1440
ggattagcct	tcaatgccag	gctcgggggt	ctcctcccat	cagtatatatt	tgggtataagc	1500
aacagactaa	taaccaggaa	cccatcaaag	tagcaaccct	aagtacctta	ctcttcaagc	1560
ctgcgggtgat	agccgactca	ggctcctatt	tctgcactgc	caagggccag	gttggctctg	1620
agcagcacag	cgacattgtg	aagtttgtgg	tcaaagactc	ctcaaagcta	ctcaagacca	1680
agactgaggc	acctacaacc	atgacatacc	ccttgaaagc	aacatctaca	gtgaagcagt	1740
cctgggactg	gaccactgac	atggatggcg	ggcgcgcccc	ggtcaccgac	aaagctgcgc	1800
actatactct	gtgcccaccg	tgcccagcac	ctgaactcct	gggggggaccg	tcagtccttc	1860
tcttcccccc	aaaacccaag	gacaccctca	tgatctcccc	gacccctgag	gtcacatgcg	1920
tgggtgggtga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtaaggtt	caactgggtac	gtggacggcg	1980
tggaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	acgtaccgtg	2040
tggctagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	tacaagtgcg	2100
aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccc	tgcagaaaac	catctccaaa	gccaaagggc	2160
agccccgaga	accacagggtg	tacaccctgc	ccccatcccc	ggaagagatg	accaagaacc	2220
aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatccccg	cgacatcgcc	gtggagtggg	2280
agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	gactccgacg	2340
gctccttctt	cctctacagc	aagctcaccg	tggacaagag	cagggtggcag	caggggaacg	2400
tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	aagagcctct	2460
ccctgtctcc	gggtaaatga	gtgcgacggc	cctagagtcg	acctgcagaa	gcttctagag	2520
tcgacctgca	gaagcttggc	cgccatggcc	caacttggtt	attgcagctt	ataatgggtta	2580
caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcatcttag	2640
ttgtggtttg	tccaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	tggatcgatc	gggaattaat	2700
tcggcgcagc	accatggcct	gaaataacct	ctgaaagagg	aacttgggtta	ggtaccttct	2760
gaggcggaaa	gaaccagctg	tggaaatgtg	gtcagttagg	gtgtggaaag	tccccaggct	2820
ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	2880
agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcacaagcat	gcactctcaat	tagtcagcaa	2940
ccatagtccc	gccccctaact	ccgcccattc	cgccccaac	tccgcccagt	tccgcccatt	3000
ctccgcccc	tggctgacta	atttttttta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctcggcct	3060
ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	tttttggagg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	3120
tgtaatttcg	aacacgcaga	tgcagtcggg	gcggcgcggt	cccagggtcca	cttcgcatat	3180
taaggtgacg	cgtgtggcct	cgaacaccga	gcgaccctgc	agcgaccgcg	ttaacagcgt	3240

caacagcgtg	ccgcagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	3300
aagatggatt	gcacgcaggt	tctccgcgcg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	3360
gggcacaaca	gacaatcggc	tgctctgatg	ccgccgtgtt	ccggctgtca	gcgcaggggc	3420
gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	3480
cagcgcggct	atcgctggctg	gccacgcagg	gcgttccttg	cgacgctgtg	ctcgacgttg	3540
tcactgaagc	gggaaggagc	tggtctctat	tgggcggaag	gccggggcag	gatctcctgt	3600
catctcacct	tgctcctgcc	gagaaaagta	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggctgc	3660
atacgcttga	tccggctacc	tgcccattcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	3720
cacgtactcg	gatggaagcc	ggtcttgtcg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	3780
ggctcgcgcc	agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgac	ggcgaggatc	3840
tcgtcgtgac	ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	3900
ctggattcat	gcactgtggc	cggtctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	3960
ctaccctgta	tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	4020
acggtatcgc	cgctcccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	4080
tctgagcggg	actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccgaac	tgccatcacg	4140
agatttcgat	tccaccgccc	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaaatc	ttttccggga	4200
cgccggctgg	atgatctctc	agcgcggggg	tctcatgctg	gagtctcttc	cccaccccg	4260
gagatggggg	aggctaactg	aaacacggaa	ggagacaata	ccggaaggaa	cccgcgctat	4320
gacggcaata	aaaagacaga	ataaaacgca	cgggtgttgg	gtcgtttgtt	cataaacgcg	4380
gggttcgggtc	ccagggtctg	cactctgtcg	ataccccacc	gagaccccat	tggggccaat	4440
acgcccgcgt	ttcttccctt	tccccacccc	aacccccaa	ttcgggtgaa	ggcccagggc	4500
tcgcagccaa	cgctggggcg	gcaagcccg	catagccacg	ggccccgtgg	gttagggacg	4560
gggtccccca	tggggaatgg	tttatgggtt	gtgggggtta	ttcttttggg	cgttgcgttg	4620
ggtcaggtcc	acgactggac	tgagcagaca	gacccatggg	ttttggatgg	cctgggcatg	4680
gaccgcatgt	actggcgcg	cacgaacacc	gggcgtctgt	ggctgccaaa	cactcccgac	4740
ccccaaaaac	caccgcgcgg	atttctggcg	ccgcccgaag	aactaaacct	gactacggca	4800
tctctgcccc	ttcttcgctg	gtacgaggag	cgcttttgtt	ttgtattggg	caccacggcc	4860
gagtttccgc	gggaccccg	ccagggcacc	tgtcctacga	gttgcatgat	aaagaagaca	4920
gtcataagt	cggcgacgat	agtcatgccc	cgccccacc	ggaaggagct	gactgggttg	4980
aaggctctca	agggcatcgg	tcgagcggcc	gcatcaaagc	aaccatagta	cgcgccctgt	5040
agcggcgcat	taagcgcggc	gggtgtgggt	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	5100
agcggccctag	cgcccgctcc	tttcgcttcc	ttcccttctc	ttctcgccac	gttcgcccgc	5160
tttccccgct	aagctctaaa	tcgggggctc	ccttgatttag	tccgattttag	tgctttacgg	5220
cacctcgacc	ccaaaaaact	tgatttgggt	gatgggtcac	gtagtggggc	atcgccctga	5280
tagacggttt	ttcgcccttt	gacgttggag	tccacgttct	ttaatagtgg	actcttgttc	5340
caaactggaa	caacactcaa	ccctatctcg	ggctattctt	ttgatttata	agggattttg	5400
ccgatttcgg	cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaaattt	5460
aacaaaatat	taacgtttac	aattttatgg	tgcaggcctc	gtgatacgcc	tatttttata	5520
ggtaaatgtc	atgataataa	tggtttctta	gacgtcaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	5580
gcgcggaacc	cctatttgtt	tatttttcta	aatacatcca	aatatgtatc	cgctcatgag	5640
acaataacc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	5700
tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	ttgctcaccc	5760
agaaacgctg	gtgaaagtta	aagatgctga	agatcagttg	gggtgcacgag	tggtttacat	5820
cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtgtt	cgccccgaag	aacgttttcc	5880
aatgatgagc	acttttaaag	ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgtg	atgacgccgg	5940
gcaagagcaa	ctcggctcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	gacttgggtg	agtactcacc	6000
agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgtgccat	6060
aacctagagt	gataacactg	cgcccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaagg	6120
gctaaccgct	tttttgcaac	acatggggga	tcatgtaact	cgccctgata	gttgggaacc	6180
ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgccag	cagcaatggc	6240
aacaacgttg	cgcaaaactat	taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	6300
aatagactgg	atggaggcgg	ataaagtggc	aggaccactt	ctgcgctcgg	cccttccggc	6360
tggtctggtt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	gggtctcggc	gtatcattgc	6420
agcactgggg	ccagatggta	agccctcccc	tatcgtagtt	atctacacga	cggggagtc	6480
ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	ggtgcctcac	tgattaaagc	6540
ttggtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	attgatttaa	aacttcattt	6600
ttaatttaaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	ctcatgacca	aaatccctta	6660
acgtgaagtt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	aagatcaaa	gatctcttgg	6720
agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgtctg	cttgcaaaca	aaaaaacacc	cgctaccagc	6780
gggtggtttg	ttgcccggatc	aagagctacc	aactcttttt	ccgaaggtaa	ctggcttcag	6840
cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	tagttaggcc	accacttcaa	6900
gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaate	ctgttaccag	tggtgctgc	6960
cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggatcaaga	cgatagttac	cggaataagg	7020
gcagcggtcg	ggctgaacgg	gggttcgtg	cacacagccc	agcttgagc	gaacgaccta	7080
caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	gccacgcttc	ccgaagggag	7140
aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	ggagagcgca	cgaggagct	7200
tccaggggga	aacgcctggt	atctttatag	tcctgtcggg	tttcgccacc	tctgacttga	7260
gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	tggaaaaacg	ccagctggca	7320

```
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct 7380
cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttcg gctcgtatgt tgtgtggaat 7440
tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattaa 7496
```

```
<210> 16
<211> 7201
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
```

5

ttcgagctcg	cccgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	60
ttagttcata	gcccataat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgcct	120
ggctgaccgc	ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	180
acgcccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	240
ttggcagtac	atcaagtgtg	tcatatgcc	agtacgccc	ctattgacgt	caatgacgg	300
aaatggcccg	cctggcatta	tgcccagtac	atgaccttat	gggactttcc	tacttggcag	360
tacatctacg	tattagtcac	cgctattacc	atggtgatgc	ggttttggca	gtacatcaat	420
gggcgtggat	agcggtttga	ctcacgggga	tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	480
gggagtttgt	tttggcacca	aaatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	caactccgcc	540
ccattgacgc	aaatgggagg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagagctcgt	600
ttagtgaacc	gtcagatcgc	ctggagacgc	catccacgct	gttttgacct	ccatagaaga	660
caccgggacc	gatccagcct	ccgcgccggg	gaacgggtga	ttggaacgcg	gattccccgt	720
gccaagagtg	acgtaagtac	cgctataga	gtctataggc	ccacccctt	ggcttggccc	780
accccttgg	cttcgttaga	acgcggtac	aattaataca	taaccttatg	tatcatacac	840
atagcattta	ggtgacacta	tagaataaca	tccactttgc	ctttcacatc	cactttgcct	900
ttctctccac	agggtgtccac	tcccaggtcc	aactgcacct	cggttctatc	gatgtctcca	960
ataaaccacc	atggggatct	tactgggcct	gctactcctg	gggcacctaa	cagtggacac	1020
ttatggccgt	cccaccttgg	aagtggcaga	gagtgttaaca	ggaccttggg	aaggggatgt	1080
gaatcttccc	tgcacctatg	accccttgca	aggctacacc	caagtcttgg	tgaagtggct	1140
ggtacaacgt	ggctcagacc	ctgtcaccat	ctttctacgt	gactcttctg	gagaccatat	1200
ccagagggca	aggtaccagg	gccgcctgca	tgtgagccac	aaggttccag	gagatgtatc	1260
cctccaattg	agcaccctgg	agatggatga	ccggagccac	tacacgtgtg	aagtcacctg	1320
gcagactcct	gatggcaacc	aagtcgtgag	agataagatt	actgagctcc	gtgtccagaa	1380
acactcctca	aagctactca	agaccaagac	tgaggcacct	acaaccatga	cataccctt	1440
gaaagcaaca	tctacagtga	agcagtcctg	ggactggacc	actgacatgg	atggggggcg	1500
cgcccaggtc	accgacaaag	ctgcgcacta	tactctgtgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	1560
actcctgggg	ggaccgtcag	tcttctctct	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	1620
ctcccggacc	cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	1680
caagttcaac	tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccgcggga	1740
ggagcagtac	aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	1800
gctgaatggc	aaggagtaca	agtgcgaagg	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	1860
gaaaaccatc	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	1920
atcccgggaa	gagatgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcctgggtca	agagtttcta	1980
tcccagcgac	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	2040
cacgcctccc	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcttc	tacagcaagc	tcaccgtgga	2100
caagagcagg	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	2160
caaccactac	acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatgagtgc	gacggcccta	2220
gagtcgacct	gcagaagctt	ctagagtcca	cttgcaaga	cttggccgcc	atggcccaac	2280
ttgtttattg	cagcttataa	tggttacaaa	taagacaata	gcatcacaaa	tttcacaaat	2340
aaagcatttt	tttctactga	ttctagtgtg	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	2400
catgtctgga	tcgatcggga	attaattcgg	cgcagacca	tggcctgaaa	taacctctga	2460
aagaggaact	tggttaggta	ccttctgagg	cggaaagaac	cagctgtgga	atgtgtgtca	2520
gttaggggtg	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	2580
caattagtca	gcaaccaggt	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	2640
aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	agtcccggcc	ctaactccgc	ccatcccggc	2700
cctaactccg	cccagttccg	cccatctctc	gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	2760
tgcagaggcc	gaggccgcct	cggcctctga	gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	2820
tggaggccta	ggcttttgca	aaaattcgaa	cacgcagatg	cagtcggggc	ggcgcggtcc	2880
caggtccact	tcgcataatta	aggtgacgcg	tgtggcctcg	aacaccgagc	gaccctgcag	2940
cgacctcgct	acagcgttca	acagcgtgcc	gcagatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	3000
cgtttcgcat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	tgggtggaga	3060
ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	3120
ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	3180
atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	3240
cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggaactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	3300
cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgcccga	gaaagtatcc	atcatggctg	3360
atgcaatcgc	gcggctgcat	acgcttgatc	cggtacacctg	cccattcgac	caccaagcga	3420
aacatcgcac	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	tcttgtcgat	caggatgatc	3480

```

tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccg ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca 3540
tgcccagacg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 3600
tgaaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 3660
atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttgccggtc gaatgggctg 3720
accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc 3780
gccttcttga cgagtctctc tgagcgggac tctgggggtt gaaatgaccg accaagcgac 3840
gccccacctg ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt 3900
cggaatcgtt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 3960
gttcttcgcc caccctggga gatgggggag gctaactgaa acacggaagg agacaatacc 4020
ggaaggaacc cgcgctatga cggcaataaa aagacagaat aaaacgcacg ggtgttgggt 4080
cgtttggtca taaacgcggg gttcgggtcc agggctggca ctctgtcgat accccaccga 4140
gaccccatg gggccaatac gcccgcgttt cttccttttc cccaccccaa ccccaagtt 4200
cgggtgaagg cccagggtc gcagccaacg tcggggcgcc aagcccgcca tagccacggg 4260
ccccgtgggt tagggacggg gtcccccatg gggaatgggt tatggttcgt gggggttatt 4320
cttttggggt ttgctggggg tcaggtccac gactggactg agcagacaga ccatgggttt 4380
ttggatggcc tgggcatgga ccgcatgtac tggcgcgaca cgaacaccgg gcgtctgtgg 4440
ctgccaatac ccccgaccc ccaaaaacca ccgcgcggtt ttctggcgaa gctgttgggt 4500
ctaaacctga ctacggcatc tctgcccctt cttcgtgtgt acgaggagcg cttttgtttt 4560
gtatttggtc ccacggccga gtttccgcgg ggcacctgtc ctacgagtgt catgataaag 4620
aagacagtca taagtgcggc gacgatagtc atgccccggt cccaccggaa ggagctgact 4680
gggttgaagg ctctcaaggg catcgggtcg gcgccgctc aaagcaacca tagtacgcgc 4740
cctgtagcgg cgcattaagg gcggcggtgt tgggtgttac ggcagcgtg accgtatcac 4800
ttgccagcgg cctagcgccc gctcctttcc ctttctttcc ttcttttctc gccacgttctg 4860
ccggctttcc ccgtcaagct ctaaactcgg ggctcccttt agggttccga tttagtgtct 4920
tacggcacct cgaccccaa aaacttgatt tgggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc 4980
cctgatagac ggtttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct 5040
tgttccaaac tggacaaca ctcaacccta tctcgggcta ttcttttgat ttataaggga 5100
ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga 5160
attttgacaa aatattaacg tttaaatatt tatggtgcag gcctcgtgat acgcctatatt 5220
ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga 5280
aatgtgcggt gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc 5340
atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 5400
caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgc 5460
caccagaaa cgttgggtgaa agttaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 5520
tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt 5580
tttccaatga tgagcacttt taaagtcttg ctatgtggcg cggattatc cgtgatgac 5640
gccgggcaag agcaactcgg tcgcccata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 5700
tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag taagagaatt atgcagtgtc 5760
gccataacca tgagtataa cactgcggcc aatttacttc tgacaacgat cggaggaccg 5820
aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg agggatcctg taactcgctt tgatcgttgg 5880
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gccagcagca 5940
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgataaaa ttactctagc ttcccgcaa 6000
caattaatag actggatgga ggcggataaa cacttctgct ctcggccctt 6060
ccggctgggt ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 6120
attgcagacc tggggccaga tggtaagccc tccgctatcg tagttatcta cagcagggg 6180
agtccaggaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt 6240
aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 6300
catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaa atcctttttg ataactctcat gaccaaatac 6360
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 6420
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaac tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 6480
ccagcgggtg ttgttttgc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggttaactggc 6540
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 6600
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct 6660
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc ggggttgact caagacgata gttaccggat 6720
aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac gagcattgag gtagcgaacg 6780
acctacacc aactgagata cctacagcgt gagcattgag aaagcgccac gcttcccgaa 6840
gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgacagag 6900
gagcttcag ggggaaacgc ctggtatctt tatagctctg tcgggtttcg ccacctctga 6960
cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 7020
tggcacgaca ggtttcccg gctggaaagc ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt 7080
tacctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt 7140
ggaattgtga gcgataaca atttcacaca ggaacagct atgaccatga ttacgaatta 7200
a 7201

```

<210> 17
 <211> 5988
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

tcgagctcgc	ccgacattga	ttattgacta	gttattaata	gtaatcaatt	acgggggtcat	60
tagttcatag	cccatataig	gagttccgcg	ttacataact	tacggtaaat	ggcccgccctg	120
gctgaccgcc	caacgacccc	cgcccattga	cgtcaataat	gacgtatggt	cccatagtaa	180
cgccaatagg	gactttccat	tgacgtcaat	gggtggagta	tttacggtaa	actgccact	240
tggcagtaca	tcaagtgtat	catatgccaa	gtacgcccc	tattgacgtc	aatgacggta	300
aatggccgcg	ctggcattat	gcccagtaca	tgaccttatg	ggactttcct	acttggcagt	360
acatctacgt	attagtcatt	gctattacca	tggtgatgcg	gttttggcag	tacatcaatg	420
ggcgtggata	gcggtttgac	tcacggggat	ttccaagtct	ccaccccat	gacgtcaatg	480
ggagtttgtt	ttggcaccac	aatcaacggg	actttccaaa	atgtcgtaac	aactccgccc	540
cattgacgca	aatgggcggt	aggcgtgtac	gggtggaggt	ctatataagc	agagctcgtt	600
tagtgaaacg	tcagatcgcc	tggagacgcc	atccacgctg	ttttgacctc	catagaagac	660
accgggaccg	atccagcctc	cgcgggcggg	aacgggtgcat	tggaaacgcg	attccccgtg	720
ccaagagtga	cgtaagtacc	gcctatagag	tctataggcc	cacccccctg	gcttggccca	780
cccccttggc	ttcgttagaa	cgcggtacac	atlaatacat	aaccttatgt	atcatcacaca	840
tacgatttag	gtgacactat	agaataacat	ccactttgcc	tttcacatcc	actttgcctt	900
tctctccaca	gggtgtccact	cccagggtcca	actgcacctc	ggttctatcg	attgaattcc	960
acgctccga	gcagcaagag	gatggaagga	tgaatagaag	tagcttcaaa	taggatggag	1020
atctcatcag	gcttgctggt	cctggggcac	ctaatagtgc	tcacctatgg	ccacccccacc	1080
ctaaaaacac	ctgagagtgt	gacagggacc	tggaaaggag	atgtgaagat	tcagtgcac	1140
tatgatcccc	tgagaggcta	caggcaaggt	ttggtgaaat	ggctggtaag	acacggctct	1200
gactccgtca	ccatcttcct	acgtgactcc	actggagacc	atatccagca	ggcaaagtac	1260
agaggccgcc	tgaagtgag	ccacaaagtt	ccaggagatg	tgtccctcca	aataaatacc	1320
ctgcagatgg	atgacaggaa	tcactataca	tgtgaggtca	cctggcagac	tcctgatgga	1380
aaccaagtaa	taagagataa	gatcattgag	ctcgtgttcc	ggaaatataa	tccacctaga	1440
atcaatactg	aagcacctac	aaccttgca	tcctctttgg	aagcaacaac	tataatgagt	1500
tcaacctctg	acttgaccac	taatgggact	ggaaaacttg	aggagaccat	tgtgtgttca	1560
gggggggtca	ccgacaagaa	aattgtgccc	agggattgtg	gttgaagcc	ttgcatatgt	1620
acagtccag	aagtatcatc	tgtcttcac	ttcccccaa	agcccaagga	tgtgtctacc	1680
attactctga	ctcctaaggt	cagctgtgtt	gtggtagaca	tcagcaagga	tgatcccgag	1740
gtccagttca	gctggtttgt	agatgatgtg	gaggtgcaca	cagctcagac	gcaaccccg	1800
gaggagcagt	tcaacagcac	tttccgctca	gtcagtgaa	ttcccatcat	gcaccaggac	1860
tggctcaatg	gcaaggagtt	caaatgcagg	gtcaacagtg	cagctttccc	tgcccccatc	1920
gagaaaacca	tctccaaaac	caaaggcaga	ccgaaggctc	cacaggtgta	caccattcca	1980
cctcccaagg	agcagatggc	caaggataaa	gtcagctga	cctgcatgat	aacagacttc	2040
ttccctgaag	acattactgt	ggagtggcag	tggaaatggc	agccagcgga	gaactacaag	2100
aacactcagc	ccatcatgga	cacagatggc	tcttacttcg	tctacagcaa	gctcaatgtg	2160
cagaagagca	actgggaggg	aggaataact	ttcacctgct	ctgtgttaca	tgagggcctg	2220
cacaaccacc	atactgagaa	gagcctctcc	cactctcctg	gtaaatgagt	cgacctgcag	2280
aagcttggcc	gccatggccc	aacttgttta	ttgcagctta	taatggttac	aaataaagca	2340
atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	tgtgtgttgt	2400
ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	ggatcgggaa	ttaattcggc	gcagcaccat	2460
ggcctgaaat	aacctctgaa	agaggaactt	ggttaggtac	cttctgaggg	ggaaagaacc	2520
agctgtggaa	tgtgtgtcag	ttaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccc	gcaggagaaa	2580
gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccaggtg	tggaaagtcc	ccaggctccc	2640
cagcaggcag	aagtatgcaa	agcatgcac	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccccccc	2700
taactccgcc	catcccgc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccatttctcg	ccccatggct	2760
gactaatttt	ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgga	ctattccaga	2820
agtagtgagg	aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctgtta	acagcttggc	2880
actggccgct	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaaccct	ggcgttaccc	aacttaatcg	2940
ccttgcagca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaatagc	gaagaggccc	gcaccgatcg	3000
cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	ctgatgcggt	attttctcct	3060
tacgcatctg	tgcggtattt	cacaccgcac	acgtcaaaag	aaccatagta	cgcgccctgt	3120
agcggcgcat	taagcgcggc	gggtgtgggt	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	3180
agcgccttag	cgcccgctcc	tttcgctttc	ttcccttcct	ttctcgccac	gttcgcccgc	3240
tttccccgct	aagctctaaa	tcgggggctc	cctttagggt	tccgatttag	tgctttacgg	3300
cacctcgacc	ccaaaaaact	tgatttgggt	gatggttcac	gtagtggg	atcgccctga	3360
tagacgggtt	ttcgcccttt	gacgttggag	tccaagtctc	ttaatagtgg	actcttgttc	3420
caaactggaa	caacactcaa	ccctatctcg	ggctattctt	ttgatttata	agggattttg	3480
ccgatttcgg	cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaaat	3540
aacaaaatat	taacgtttac	aattttatgg	tgacttctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	3600
gcatagttaa	gccagccccg	acacccgcga	acacccgctg	acgcgcccctg	acgggcttgt	3660
ctgctcccg	catccgctta	cagacaagct	gtgacgctct	ccgggagctg	catgtgtcag	3720
aggttttcac	cgtcatcacc	gaaacgcgcg	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctattt	3780
ttataggtta	atgtcatgat	aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggga	3840
aatgtgcgcg	gaacccctat	ttgtttattt	ttctaaat	attcaaatat	gtatccgctc	3900
atgagacaat	aaccttgata	aatgcttcaa	taattattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	3960

```

caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt ttgcgccat ttgacctcc tgtttttgct 4020
caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 4080
tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt 4140
tttccaatga tgagcacttt taaagtcttg ctatgtggcg cgggtattatc ccgtattgac 4200
gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatagactt ggttgagtac 4260
tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag taagagaatt atgcagtgc 4320
gccataacca tgagtataaa cactgcccgc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 4380
aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg 4440
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gctgtagca 4500
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcaactac ttactctagc ttcccggcaa 4560
caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccgcccct 4620
ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc 4680
attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tccgctatcg tagttatcta cgcgacgggg 4740
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcactgatt 4800
aagcattggt aactgtcaga ccaagtctac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 4860
catttttaat ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataattctcat gaccaaaatc 4920
ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccc tagaaaaagat caaaggatct 4980
tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 5040
ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 5100
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 5160
ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcgtctgc taatcctgtt accagtggct 5220
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc ggggttgact caagacgata gttaccggat 5280
aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg 5340
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga 5400
gggagaaagg cggacaggtg tccggttaag ggcaggggtc gaacaggaga gcgcacgagg 5460
gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggttttcg ccacctctga 5520
cttgagcgtc gattttttgtg atgctcgtca gggggggcga gcctatggaa aaacgccagc 5580
aacgcggcct ttttacgggt cctggccctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttttct 5640
gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct 5700
cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcagc tcagtgcagc aggaagcga agagcgccca 5760
atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 5820
tttcccgcag ggaaagcggg cagtgcagcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 5880
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtggt aattgtgagc 5940
ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gacatgatta cgaattaa 5988

```

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 18
 tctctgtctc caagcccaca g 21

<210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sonda oligonucleotídica sintética

<400> 19
 ctttgaggag tctttgacc 19

<210> 20
 <211> 1293
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión huCRIg corto-IgG

<400> 20

acctcgggttc tatcgatgct ctcaataaac caccatgggg atcttactgg gcctgctact 60
cctggggcac ctaacagtggt acacttatgg ccgtcccatc ctggaagtgc cagagagtgt 120

aacaggacct tggaaagggg atgtgaatct tccctgcacc tatgaccccc tgcaaggcta 180
caccacaagtc ttggtgaagt ggctgggtaca acgtgggtca gacctgtca ccattcttct 240
acgtgactct tctggagacc atatccagca ggcaaagtac cagggccgcc tgcattgtgag 300
ccacaagggtt ccaggagatg tatccctcca attgagcacc ctggagatgg atgaccggag 360
ccactacacg tgtgaagtca cctggcagac tcctgatggc aaccaagtcg tgagagataa 420
gattactgag ctccgtgtcc agaaacactc ctcaaagcta ctcaagacca agactgaggc 480
acctacaacc atgacatacc ccttgaaagc aacatctaca gtgaagcagt cctgggactg 540
gacctactgac atggacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg 600
gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga 660
ccctgagggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa 720
ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 780
caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg 840
caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaaccat 900
ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga 960
agagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga 1020
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc 1080
cgtgctggag tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag 1140
gtggcagcag gggaaacgtc tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta 1200
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccct agagtcgacc 1260
tgcagaagct tctagagtcg acctgcagaa gct 1293

<210> 21
<211> 1556
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión huCRlg largo-IgG

<400> 21

atcgattaaa ccaccatggg gatcttactg ggcctgctac tcctggggca cctaacagtg 60
gacacttatg gccgtcccat cctggaagtg ccagagagtg taacaggacc ttggaaggg 120
gatgtgaatc ttccctgcac ctatgacccc ctgcaaggct acaccaagt cttggtgaag 180
tggctgggtac aacgtggctc agaccctgtc accatctttc tacgtgactc ttctggagac 240
catatccagc aggcacaagta ccagggccgc ctgcatgtga gccacaaggt tccaggagat 300
gtatccctcc aattgagcac cctggagatg gatgaccgga gccactacac gtgtgaagtc 360
acctggcaga ctctgatgg caaccaagtc gtgagagata agattactga gctccgtgtc 420
cagaaactct ctgtctccaa gccacagtg acaactggca gcggttatgg ctccacgggtg 480
ccccaggga tgaggattag ccttcaatgc caggctcggg gttctctctc catcagttat 540
atcttggtata agcaacagac taataaccag gaacccatca aagtagcaac cctaagtacc 600
ttactcttca agcctgagg gatagccgac tcaggctcct atttctgcac tgccaagggc 660
caggttggct ctgagcagca cagcgacatt gtgaagtttg tggtaaaaga ctctcaaag 720
ctactcaaga ccaagactga ggcacctaca accatgacat accccttgaa agcaacatct 780
acagtgaagc agtcctggga ctggaccact gacatggata aaactcacac atgcccaccg 840
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 900
gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcy tgggtgggtga cgtgagccac 960
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1020
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1080
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1140
ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg 1200
tacaccctgc cccatccccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1260
gtcaaaaggc tctatccacg cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1320
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1380
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1440
catgaggctc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1500
gtgcgacggc cctagagtcg acctgcagaa gcttctagag tcgacctgca gaagct 1556

<210> 22
<211> 20
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

5

<400> 22
ccactggtcc cagagaaagt 20

10

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 23
cactattagg tggcccagga 20

20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico sintético

<400> 24
gggaggattg ggaagacaat 20

30

<210> 25
<211> 1454
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Fusión huCRIGlargo-Fc

40

<400> 25

atcgattaaa	ccaccatggg	gatcttactg	ggcctgctac	tcctggggca	cctaacagtg	60
gacacttatg	gccgtcccat	cttgggaagt	ccagagagtg	taacaggacc	ttggaaaggg	120
gatgtgaatc	ttccctgcac	ctatgacccc	ctgcaaggct	acacccaagt	cttgggtgaag	180
tggctgggtac	aacgtggctc	agaccctgtc	accatctttc	tacgtgactc	ttctggagac	240
catatccagc	aggcaaagta	ccaggggccgc	ctgcatgtga	gccacaaggt	tccaggagat	300
gtatccctcc	aattgagcac	cctggagatg	gatgaccgga	gccactacac	gtgtgaagtc	360
acctggcaga	ctcctgatgg	caaccaagtc	gtgagagata	agattactga	gctccgtgtc	420
cagaaactct	ctgtctccaa	gcccacagtg	acaactggca	gcggttatgg	cttcacggtg	480
ccccagggaa	tgaggattag	ccttcaatgc	caggctcggg	gttctcctcc	catcagttat	540
atttggtata	agcaacagac	taataaccag	gaacccatca	aagtagcaac	cctaagtacc	600
ttactcttca	agcctgcggt	gatagccgac	tcaggctcct	atctctgcac	tgccaagggc	660
caggttggtc	ctgagcagca	cagcgacatt	gtgaagtttg	tggtcåaaga	ctccgataaa	720
actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	780
ttccccccaa	aaccaagga	caccctcatg	atctcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	840
gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	900
gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	960
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	1020
gtctccaaca	aagccctccc	agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1080
ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatcccggg	aagagatgac	caagaaccag	1140
gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	1200
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	1260
tccttcttcc	tctacagcaa	gctcaccgtg	gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	1320
ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	1380
ctgtctccgg	gtaaatgagt	gcgacggccc	tagagtgcac	ctgcagaagc	ttctagagtc	1440
gacctgcaga	agct					1454

<210> 26

<211> 1556
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Fusión huCRlg largo-Fc

<400> 26

```
atcgattaaa ccaccatggg gatcttactg ggcctgctac tcctggggca cctaacagtg 60
gacacttatg gccgtcccat cctggaagtg ccagagagtg _taacaggacc ttggaagggg 120
```

```
10 gatgtgaatc ttccctgcac ctatgacccc ctgcaaggct acacccaagt cttggtgaag 180
   tggctggtag aacgtggctc agaccctgtc accatcttcc tacgtgactc ttctggagac 240
   catatccagc aggcaaagta ccagggccgc ctgcatgtga gccacaagggt tccaggagat 300
   gtatccctcc aattgagcac cctggagatg gatgaccgga gccactacac gtgtgaagtc 360
   acctggcaga ctctgatgg caaccaagtc gtgagagata agattactga gctccgtgtc 420
   cagaaactct ctgtctccaa gcccacagt gacaactggca gcggttatgg cttcacggtg 480
   ccccgaggaa tgaggattag ccttcaatgc caggctcggg gttctcctcc catcagttat 540
   atttgggtata agcaacagac taataaccag gaacccatca aagtagcaac cctaagtacc 600
   ttactcttca agcctgcggt gatagccgac tcaggctcct atttctgcac tgccaagggc 660
   caggttggct ctgagcagca cagcgacatt gtgaagtttg tggtaaaga ctctcaaaag 720
   ctactcaaga ccaagactga ggcacctaca accatgacat accccttgaa agcaacatct 780
   acagtgaagc agtcctggga ctggaccact gacatggata aaactcacac atgcccaccg 840
   tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 900
   gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgag tgggtggtgga cgtgagccac 960
   gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1020
   acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1080
   ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1140
   ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1200
   tacaccctgc ccccatcccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1260
   gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1320
   aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1380
   aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1440
   catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1500
   gtgcgacggc cctagagtcg acctgcagaa gccttctagag tcgacctgca gaagct 1556
```

<210> 27
<211> 1172
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Fusión huCRlg corto-Fc

<400> 27

atcgattaaa	ccaccatggg	gatcttactg	ggcctgctac	tcctggggca	cctaacagtg	60
gacacttatg	gccgtcccat	cctggaaagt	ccagagagtg	taacaggacc	ttggaaaggg	120
gatgtgaatc	ttccctgcac	ctatgacccc	ctgcaaggct	acacccaagt	cttgggtgaag	180
tggctggtac	aacgtggctc	agaccctgtc	accatctttc	tacgtgactc	ttctggagac	240
catatccagc	aggcaaagta	ccagggccgc	ctgcatgtga	gccacaaggt	tccaggagat	300
gtatccctcc	aattgagcac	cctggagatg	gatgaccgga	gccactacac	gtgtgaagtc	360
acctggcaga	ctcctgatgg	caaccaagtc	gtgagagata	agattactga	gctccgtgtc	420
cagaaacact	ccgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	480
ggaccgtcag	tcttctctct	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctccccgacc	540
cctgaggtca	catgctgtgt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	600
tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagaca	agccgcggga	ggagcagtag	660
aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcttc	accgtctctg	accaggactg	gctgaatggc	720
aaggagtaca	agtgcagggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	780
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atccccggaa	840
gagatgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcctgggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	900
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	960
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcttc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1020
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgtcatg	aggctctgca	caaccactac	1080
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatgagtg	gacggcccta	gagtcgacct	1140
gcagaagctt	ctagagtcga	cctgcagaag	ct			1172

<210> 28
 <211> 1293
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fusión huCRlgcorto-Fc

<400> 28

acctcgggttc	tatcgatgct	ctcaataaac	caccatgggg	atcttactgg	gcctgctact	60
cctggggcac	ctaacagtg	acacttatgg	ccgtcccatc	ctggaagtgc	cagagagtg	120
aacaggacct	tggaaagggg	atgtgaatct	tccctgcacc	tatgaccccc	tgcaaggcta	180
cacccaagtc	ttggtgaagt	ggctggtaca	acgtggctca	gaccctgtca	ccatctttct	240
acgtgactct	tctggagacc	atatccagca	ggcaaagtac	cagggccgcc	tgcattgtgag	300
ccacaagggt	ccaggagatg	tatccctcca	attgagcacc	ctggagatgg	atgaccggag	360
ccactacacg	tgtgaagtca	cctggcagac	tctgatggc	aaccaagtgc	tgagagataa	420
gattactgag	ctccgtgtcc	agaaacactc	ctcaaagcta	ctcaagacca	agactgaggc	480
acctacaacc	atgacatacc	ccttgaaagc	aacatctaca	gtgaagcagt	cctgggactg	540
gaccactgac	atggacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	600
gggaccgtca	gtcttctctt	tcccccaaaa	acccaaggac	accctcatga	tctccccgac	660
ccctgaggtc	acatgcgtgg	tgggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	720
ctgggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	780
caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	840
caaggagtac	aagtgcagg	tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	agaaaaccat	900
ctccaaagcc	aaagggcagc	cccagagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catccccgga	960
agagatgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctgggtc	aaaggcttct	atccccagcga	1020
catcgccgtg	gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	1080
cgtagctggac	tccgacggct	ccttcttctt	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	1140
gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtagatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	1200
cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatgagtg	cgacggccct	agagtcgacc	1260
tgcagaagct	tctagagtcg	acctgcagaa	gct			1293

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido CRlg, o una inmunoadhesina CRlg que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección ocular asociada al complemento, en donde el polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg son un inhibidor selectivo de la ruta alternativa del complemento.
- 10 2. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 1, en donde el polipéptido CRlg se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos CRlg de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, y los dominios extracelulares (DEC) de dichos polipéptidos.
- 15 3. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido CRlg es el DEC de un polipéptido CRlg de SEC ID N°: 2, 4, 6 u 8.
- 20 4. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido CRlg es el DEC de un polipéptido CRlg de SEC ID N°: 4 o 6.
- 25 5. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 1, en la que la secuencia de inmunoglobulina es una secuencia de región constante de inmunoglobulina.
- 30 6. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 5, en la que la secuencia de región constante de la inmunoglobulina es la de una cadena pesada de inmunoglobulina.
- 35 7. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 6, en la que la secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se fusiona a una región extracelular de un polipéptido CRlg de SEC ID N°: 2, 4, 6 u 8 para producir una proteína de fusión CRlg-Ig.
- 40 8. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 7, en la que dicha secuencia de región constante de inmunoglobulina es la de una IgG.
- 45 9. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 8, en la que dicha IgG es una IgG-1 o una IgG-3.
- 50 10. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 9, en la que la secuencia de región constante de cadena pesada de IgG-1 comprende al menos una región bisagra, CH2 y CH3.
- 55 11. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 9, en la que la secuencia de región constante de cadena pesada de IgG-1 comprende una región bisagra, CH1, CH2 y CH3.
- 60 12. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 7, en la que la proteína de fusión CRlg-Ig comprende un enlazador entre las secuencias de CRlg y de Ig.
- 65 13. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 7, en la que la proteína de fusión CRlg-Ig esta codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 20, 21, 25, 26, 27 y 28.
14. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 1, en donde la afección ocular asociada al complemento se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), neovascularización coroidal (NVC), uveítis, retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con isquemia, endoftalmitis, edema macular diabético, miopía patológica, enfermedad de von Hippel-Lindau, histoplasmosis ocular, Oclusión de la Vena Central de la Retina (OVCR), neovascularización corneal y neovascularización retiniana.
15. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 14, en donde la enfermedad ocular asociada al complemento es degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) o neovascularización coroidal (NVC).
16. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 15, para su uso en la prevención de la NVC.
17. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 15, para su uso en la prevención de la progresión de la DMRE.
18. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 17, para su uso en la prevención de la progresión de la DMRE a NVC.
19. Un polipéptido CRlg, o una inmunoadhesina CRlg, que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en la prevención del desarrollo o de la progresión de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) en un sujeto con riesgo de desarrollar una DMRE o que presenta un diagnóstico de DMRE en al menos un ojo.

20. El polipéptido CRlg de la reivindicación 19, que es tal como se define en la reivindicación 3 o en la reivindicación 4.
- 5 21. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 19, en la que el polipéptido de fusión comprende el dominio extracelular de un polipéptido de SEC ID N°: 4 o 6 fusionado a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.
- 10 22. La inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 21, en la que el polipéptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos de fusión codificados por las secuencias de nucleótidos de SEC ID N°: 20, 21, 25, 26, 27 y 28.
- 15 23. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde el sujeto es un ser humano.
- 20 24. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 23, en donde el sujeto humano presenta un diagnóstico de DMRE en al menos un ojo.
- 25 25. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 24, en donde dicha DMRE es DMRE seca de categoría 3 o de categoría 4.
- 30 26. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 25, en donde dicho sujeto se ha identificado como que está expuesto a un riesgo a desarrollar NVC.
- 35 27. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 26, en donde dicho sujeto está genéticamente expuesto a un riesgo a desarrollar NVC.
- 40 28. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 28, en donde dicho sujeto humano presenta un diagnóstico de DMRE en los dos ojos.
- 45 29. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 28, en el que dicho sujeto humano tiene una DMRE de categoría 3 o categoría 4 en los dos ojos.
- 50 30. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 23, que ralentiza la progresión de la DMRE.
- 55 31. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 25, que retrasa la progresión de la DMRE a NVC.
- 60 32. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 23, que previene la progresión de la DMRE a NVC.
- 65 33. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 24, en donde el sujeto humano presenta un diagnóstico de DMRE en un solo ojo.
34. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 33, que retrasa el desarrollo de la DMRE en el otro ojo.
35. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 33, que previene el desarrollo de la DMRE en el otro ojo.
36. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 23, que es para una administración por inyección intravítrea.
37. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 23, que es para una administración junto con un agente adicional para la prevención o el tratamiento de la DMRE o de la NVC.
38. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg de la reivindicación 37, en donde dicho agente adicional es un anticuerpo anti-VEGF-A.
39. Un polipéptido CRlg, o una inmunoadhesina CRlg que comprende un polipéptido CRlg fusionado a una secuencia de inmunoglobulina, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) seca.
40. El polipéptido CRlg o la inmunoadhesina CRlg para su uso como se define en la reivindicación 39, que es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

1 CCGACGGTC CGCCCAAGCG TCGGCCACG GGTCCGCCA CGCGTCGGG CCACAGAAG TTGAGCCTC TTGCTAGCA GGAGGCTGGA AGAAAGGACA
 GGGTGGCAG GGGGTGGC AGGGGGTG CAGGGGGT GCGAGGGCC GGTGCTTC AACTCGGAG AAACCATCGT CCTCGAOC TCTTCTCTGT
 101 GAAGTAGCTC TGGCTGTGAT GGGGATCTTA CTGGCCCTGC TACTCCTGGG GCACCTAACA GTGGACACTT ATGGCCGTCC CATCCTGGAA GTGCCAGAGA
 CTTGATCGAG ACCGACACTA CCGCTAGAAAT GACCGGAGC ATGAGGACCC CGTGGATTGT CACCTGTGAA TACCGGCAGG GTAGGACCTT CACGGTCTCT
 1 SEC ID Nº:2 M₁G I L L G L L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S
 201 GTGTAACAGG AOCCTTGAAA GGGGATGTGA ATCTTCCCTG CACCTATGAC CCGCTGGAAG GCTAGACCCA AGTCTTGGTG AAGTGGCTGG TACAACGTGG
 CACATTGTCC TGGAACTTT CCGCTACACT TAGAAGGAG GTGGATACTG GGGAGGTTTC CGATGTGGT TCAGAACCCAC TTCACCGACC ATGTTGCACC
 29 V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G
 301 CTCAGACCT GTCAACATCT TTCTACGTGA CTCTTCTGGA GACCATAATCC AGCAGGCAAA GTACAGGGC CGCTGCATG TGAGCCACAA GGTTCCAGGA
 GAGTCTGGGA CAGTGGTAGA AAGATGCACT GAGAAGACCT CTGGTATAGG TCGTCCGTTT CATGGTCCCG GCGGACGTAC ACTCGGTGTT CCAAGGTCTCT
 62 S D P V T I F L R D S S G D H I Q A K Y Q G R L H V S H K V P G
 401 GATGTATCC TCGAATTGAG CACCTGGAG ATGGATGACC GGAGCCACTA CACGTGTGAA GTCACTCTGA TGGCAACCAA GTCGTGAGAG
 CTACATAGG AGGTTAACTC GTGGGACCTC TACCTACTGG CCTCGGTGAT GTGCACACTT CAGTGGACCG TCTGAGGACT ACCGTGGT CAGCACTCTC
 95 D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D
 501 ATAAGATTAC TGAGCTCGT GTCCAGAAAC TCTCTGTCTC CAAGCCACA GTGACAACTG GCAGGGTTA TGGCTTCAAG GTGCCCCAGG GAATGAGGAT
 TATTCTAATG ACTCGAGGCA CAGTCTTTTG AGAGACAGAG GTTCGGGTGT CACTGTGTGAC CGTGCCCAAT ACCGAAGTGC CACGGGGTCC CTTACTCTCA
 129 K I T E L R V Q K L S V S K P T V T T G S G Y G F T V P Q G M R I
 601 TAGCCTTCAA TGCCAGGCTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTGGT ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGAACCCA TCAAGTAGC AACCTAAGT
 ATCGGAAGTT ACCGTCCGAG CCCCAGAGG AGGGTAGTCA ATATAAACA TATTCGTGT CTGATTATG GTCTTGGGT AGTTTCATCG TTGGGATTCA
 162 S L Q C Q A R G S P I S Y I W Y K Q Q T N N Q E P I K V A T L S
 701 ACCTTACTCT TCAAGCCTGC GGTGATAGCC GACTCAGGCT CCTATTCTG CACTGGCAAG GGGCAGGTG GCTCTGAGCA GCACAGGAGC AATGTGAAGT
 TGGAAATGAGA AGTTGGGACG CCACATATCG CTGAGTCGGA GGATAAAGAC GTGACGGTTC CCGGTCCCAAC CGGACTCGT CGTGTGCTG TAACACTTCA
 195 T L L F K P A V I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F
 801 TTGTGGTCAA AGACTCTCA AAGCTACTCA AGACCAAGAC TGAGGCACCT ACAACCATGA CATACCCCTT GAAAGCAACA TCTACAGTGA AGCAGTCTG
 AACACCAGTT TCTGAGGAGT TCGATGAGT TCTGGTCTG ACTCCGTGGA TGTTGGTACT GTATGGGGA CTTTCGTGT AGATGTCAC TCGTCAGGAC
 229 V V K D S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W

Figura 1A (SEC ID: 1, 2)

901 GGACTGGACC ACTGACATGG ATGGCTACCT TGGAGAGACC AGTGCCTGGC CAGGAAAGAG CTTGCCTGTC TTGCCATCA TCCTCATCAT CTCCTTGTC
 CCTGACCTGG TGACTGTACC TACGATGGA ACCTCTCTGG TCACGACCG GTCTTCTC GGACGGACAG AACGGTAGT AGGAGTAGTA GAGGAACACG
 262 D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C
 1001 TGTATGGTGG TTTTAAOCAT GGCCTATATC ATGCTCTGTC GGAAGACATC CCAACAAGAG CATGTCTACG AAGCAGCCAG GTAAGAAAGT CTCCTCTCTT
 ACATAACCACC AAAAATGGTA CCGGATATAG TACGAGACAG CCTTCTGTAG GGTGTCTC GTACAGATGC TTGTCGGTC CATTCCTTCA GAGAGGAGAA
 295 C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q Q E H V Y E A A R O
 1101 CCATTTTGA CCCCCTCCCT GCCTCAATT TTGATTACTG GCAGGAATG TGGAGGAAGG GGGGTGTGG ACAGACCCAA TCCTAAGGCC GGAGGCCCTC
 GGTA AAAACT GGGCAGGA CCGGAGTTAA AACTAATGAC CGTCTTTAC ACCTCTTCC CCCACACCG TGCTGGGT AGGATTCGG CCTCCGGAAG
 1201 AGGGTCAGGA CATAGCTGCC TTCCCTCTCT CAGGCACCTT CTGAGTTGT TTTGGCCCTC TGAACACAAA GGATAATTTA GATCCATCTG CCTTCTGCTT
 TCCAGTCT GTATCGACGG AAGGGAGAGA GTCCGTGGA GACTCCNACA AAACCGGAG ACTTGTGTTT CCTATTAAAT CTAGTAGAC GGAAGACGAA
 1301 CCAGAATCCC TGGGTGGTAG GATCTGTATA ATTAATTGSC AAGAATTGAG GCAGAAAGGT GGGAAACCAG GACCACAGCC CCAAGTCCCT TCTTATGGGT
 GGTCTTAGGG ACCCACCATC CTAGGACTAT TAATTAACCG TTCTTAACTC CGTCTTCCA CCCTTTGGTC CTGGTGTGG GGTTCAGGGA AGAATACCCA
 1401 GGTGGGCTCT TGGGCCATAG GGCACATGCC AGAGAGGCCA ACGACTCTGG AGAAACCATG AGGTGGCCA TCTTGGCAAG TGCTGTCTCC AGTGATGAGC
 CCACCCGAGA ACCCGGTATC CCGGTGACGG TCTCTCGGT TGCTGAGACC TCTTTGGTAC TCCACCGGT AGAAGCGTT ACCGACGAGG TCACTACTCG
 1501 CAACTTCCCA GAATCTGGC AACAACACT CTGATGAGCC CTGATAGGA CAGGAGTACC AGATCATGG CCAGATCAAT GGCACACTAG CCCGCCCTGT
 GTTGAAGGGT CTTAGACCGG TTGTTGATGA GACTACTCGG GAOGTATCCT GTCTCATGG TCTAGTAGOG GGTCTAGTTA CCGTTGATGC GGGCGGACGA
 1601 GGACACAGTT CCTCTGGATT ATGAGTTTCT GGCCACTGAG GGCAAAAGTG TCTGTTAAA ATGCCCAT AGSCCAGGAT CTGCTGACAT AATTGCCCTAG
 CCTGTGTCAA GGAGACCTAA TACTCAAAGA CCGGTGACTC CCGTTTTCAC AGACAATTT TACGGGTAA TCCGGTCTA GACGACTGTA TTAACGGATC
 1701 TCAGTCTTG CCTTCTGCAI GGCCTTCTC CCTGCTACCT CTCTTCTGG ATAGCCCAA GTGTCCGCT ACCAACACTG GAGCCGCTGG GAGTCACTGG
 AGTCAGGAAC GGAAGAOGTA CCGGAAGAAG GGACGATGGA GAGAAGGACC TATCGGTTT CACAGGCGGA TGGTTGTGAC CTCGGCGACC CTCAGTGACC
 1801 CTTTGCCCTG GAAATTGCCA GATGCATCTC AAGTAAGCCA GCTGCTGGAT TTGGCTCTGG GCGCTTCTAG TATCTCTGCC GGGGGCTTCT GGTACTCCTC
 GAAACGGAC CTTAAACGGT CTACGTAGAG TTCAATTCGGT CGACGACCTA AACCGAGACC CCGGAAGATC ATAGAGACGG CCCCCGAAGA CCATGAGGAG
 1901 TCTAAATACC AGAGGGAAGA TGCCCATAGC ACTAGGACTT GGTCAATCAG CCTACAGACA CTATTCAACT TTGGCATCTT GCCACCAGAA GACCCGAGGG
 AGATTTATGG TCTCCCTTCT ACSSGTATCG TGATCCTGAA CCAGTAGTAC GGATGTCTGT GATAAGTTGA AACCGTAGAA CCGTGGTCTT CTGGGCTCC
 2001 AGGCTCAGCT CTGCCAGCTC AGAGGACCAG CTATATCCAG GATCAATTCT CTTTCTTTCAG GGCAGACAG CTTTAAATTG AAATTGTTAT TTCACAGGCC
 TCCGAGTGA GACGGTGGAG TCTCTCTGTC GATATAGGTC CTAGTAAGA GAAAGAGTC CCGTCTGTC GAAAATTAAC TTTAACAATA AAGTGTCCGG
 2101 AGGTTTCACT TCTGCTCTC CACTATAAGT CTAATGTTCT GACTCTCTCC TGGTGTCAA TAAATATCTA ATCATAACAG C
 TCCCAAGTCA AGACGAGGAG GTGATATTCA GATTACAAGA CTGAGAGAGG ACCACGAGTT ATTATAGAT TAGTATTGTC G

Figura 1B
 (SEC ID: 1, 2)

1 CCAACTGCAC CTGGTTCTA TCGATAGGAG GCTGGAAGAA AGGACAGAAG TAGCTCTGGC TGTGATGGG ATCTTACTGG GCCTGCTACT CCTGGGGCAC
 GGTGACGTG GAGCAAGAT AGCTATCCTC CGACCTTCTT TCCTGTCTTC ATGAGAGCCG AACTTACCCC TAGAATGACC CGGACGATGA GGACCCCGTC
 1 M G I L L G L L L L G H
 ^MET
 101 CTAAACAGTGG AACTTATGG CCGTCCCATC CTGGAAGTGC CAGAGAGTGT AACAGGACCT TGGAAAGGGG ATGTGAATCT TCCCTGCACC TATGACCCCC
 GATTGTCAAC TGTGAATACC GGCAGGGTAG GACCTTACAG GTCTCTCACA TTGTCTGGA ACCCTTCCCC TACACTTAGA AGGACGTTGG ATACTGGGGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L
 201 TGC AAGGCTA CACCAAGTC TTGGTGAAGT GGCTGGTACA ACGTGGCTCA GACCTGTGCA CCATCTTTCT ACGTGACTCT TCTGGAGACC ATATCCAGCA
 ACGTTCCGAT GTGGGTTTCA AACCACTTCA CCGAACCAGT TGCACCGAGT CTGGGACAGT GGTAGAAGA TGCACCTGAGA AGACCTCTGG TATAGGTGCT
 47 Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q
 301 GGC AAGTAC CAGGGCCGCC TGCATGTGAG CCACAAGTT CCAGGAGATG TATCCCTCCA ATTGAGCACC CTGGAGATGG ATGACCGGAG CCACTACACG
 CCGTTTCATG GTCCCCGGGG ACGTACACTC GGTGTTCCAA GGTCTCTTAC ATAGGAGGT TAACTGTGTTG GACCTCTACC TACTGGCCTC GGTGATGTGC
 80 A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 TGTGAAGTCA CCTGGCAGAC TCCTGATGGC AACCAAGTGG TGAGAGATAA GATTACTGAG CTCCTGTGTC AGAACTCTC TGTCTCCAAG CCCACAGTGA
 AACTTTCAGT GGACCGTCTG AGGACTACCG TTGGTTCAGC ACTCTCTATT CTAATGACTC GAGGCACAGG TCTTTGAGAG ACAGAGGTTT GGGTGTCACT
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T
 501 CAACTGGCAG CGGTTATGG TTCAOAGTGC CCCAGGGAAT GAGGATTAGC CTTCATGOC AGGTCGGGG TTCTCTCTCC ATCAGTTATA TTTGGTATAA
 GTTGACCGTC GCCAATACCG AAGTGCCACG GGGTCCCTTA CTCCTAATCG GAAGTTAOCG TCCGAGCCCC AAGAGGAGGG TAGTCAATAT AAACCATATT
 147 T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K

Figura 2A

601 GCAACAGACT AATAACCAGG AACCCATCAA AGTAGTACCT TACTCTTCAA GCGTGGGTG ATAGCGACT CAGGCTCCTA TATCTGACT
 CGTGTCTGA TTATGGTCC TTGGGTAGTT TCATCGTTGG GATTCAATGA ATGAGAAGTT OGGACGCCAC TATCGGCTGA GTCGAGGAT AAAGACGTGA
 180 Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T

 701 GCCAAGGGCC AGGTGGCTC TGAGCAGCAC AGCGACATTG TGAAGTTTGT GGTCAAAGAC TCCTCAAAGC TACTCAAGAC CAAGACTGAG GCACCTACAA
 CGGTTCGCCG TCCAACCGAG ACTCGTGGTG TCGCTGTAAC ACTTCAAACA CCAGTTTCTG AGGAGTTTCG ATGAGTTCTG GTTCTGACTC CGTGGATGTT
 213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T

 801 CCATGACATA CCGCTTGAAA GCAACATCTA CAGTGAAGCA GTCCTGGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGGG GAGACCAAGTG CTGGGCCAGG
 GGTACTGTAT GGGGAACCTT CGTTGTAGAT GTCACTTGGT CAGGACCGTG ACCTGGTGAC TGTACCTACC GATGGAACCT CTCGTGTCAC GACCCGGTCC
 247 M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G

 901 AAAGAGCCTG CCTGTCTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGCTGTA TGGTGGTTT TACCATGGCC TATAICATGC TCTGTGGAA GACATCCCAA
 TTTCTCGGAC GGACAGAAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACACGACAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTACG AGACAGCCTT CTGTAGGGTT
 280 K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q

 1001 CAAGAGCATG TCTACGAAGC AGCCAGGGCA CATGCGAGAG AGGCCAAGCA CTCIGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT CGCAAGTGGC TGCTCCAGTG
 GTTCTCGTAC AGATGCTTGG TCGGTCCCGT GTACGGTCTC TCCGGTTGCT GAGACCTCTT TGGTACTCCC ACCGGTAGAA GCGTTCACCG ACGAGGTAC
 313 Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D

 1101 ATGAGCCAAC TTCCAGAAAT CTGGGCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCGAG ATCAATGGCA ACTACGCCCG
 TACTCGTTG AAGGGTCTTA GACCGTTGT TGATGAGACT ACTCGGGACG TATCCTGTCC TCATGGTCTA GTAGCGGTC TAGTTACCGT TGATCGGGC
 347 E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R

 1201 CCTGCTGGAC ACAGTCTCTC TGGATTATGA GTTCTG3CC ACTGAGGGCA AAAGTGTCTG TTAATAATGC CCCATTAGGC CAGGATCTGC TGACATAATC
 GGACGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAAGACCGG TGACTCCCGT TTTACAGAC AATTTTACG GGGTAATCCG GTCCTAGACG ACTGTATTAG
 380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

 1301 TAGAGTCGAC CTGCAGAAGC TTGGCCG9CA TGGCCCAACT TGTTTATTGC AGGTTATAAT GGTACAAAT AA
 ATCTCAGCTG GAGCTCTTCG AACCGGCGGT ACCGG3TTGA ACAATAACG TCGAATATTA CCAATGTTTA TT

Figura 2B

1 GTCCAACACTGC ACCTGGGTTT TATCGATAGG AGGCTGGAAG AAAGGACAGA AGTAGCTCTG GCTGTGATGG GGATCTTACT GGGCTGCTA CTCCTGGGGC
 CAGGTTGACG TGGAGCCAAG ATAGCTATCC TCGACCTTC TTCTCTGTCT TCATCGAGAC CGACACTACC CCTAGAATGA CCGGAGCGAT GAGGACCCCG
 1 ^el inserto comienza aquí M G I L L G L L L L G H
 101 ACCTAACAGT GGACACTTAT GGCCTGCGA TCCCTGGAGT GCCAGAGAGT GTAACAGGAC CTTGGAAAGG GGATGTGAAT CTTCCCTGGA CCTATGACCC
 TGGATTGTCA CCTGTGAATA CCGGCAGGGT AGSACCTTCA CCGTCTCTCA CATTGTCTG GAACCTTTCC CCTACACTTA GAAGGGAGT GGATCTGGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P
 201 CCTGCAAGGC TACACCCAAAG TCTTGGTGAA GTGGCTGGTA CAACGTGGCT CAGACCCCTGT CACCATCTTT CTAAGTGACT CTCTGGAGA CCATATCCAG
 GGACGTTCCG ATGTGGGTTT AGAACCACTT CAACCGACCAT GTTGCACCGA GTCTGGGACA GTGGTAGAAA GATGCACTGA GAAGACCTCT GGTATAGGTC
 46 L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q
 301 CAGGCAAAGT ACCAGGCGG CCTGGATGTG AGCCACAAGG TTCCAGGAGA TGTATCCCTC CAATTGAGCA CCTGGAGAT GGATGACCGG AGCCACTACA
 GTCCGTTTCA TGGTCCCGG GGACGTACAC TCGGTGTTCC AAGTCTCTT ACATAGGGAG GTTAACTCGT GGGACCTCTA CCTACTGGCC TCGGTGATGT
 79 Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 CGTGTGAAGT CACCTGGCAG ACTCCTGATG GCAACCAAGT CGTGAGAGAT AAGATTACTG AGCTCCGTTG CCAGAAAGAC TCCTCAAAGC TACTCAAGAC
 GCACACTTCA GTGGACCGTC TGAGGACTAG CGTTGGTTCA GCACCTCTCA TTCTAATGAC TCGAGGCCACA GGTCCTTTGTG AGGAGTTTGG ATGAGTTCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T
 501 CAAGACTGAG GCACCTACAA CCATGACATA CCCCCTTGAAG GCAACATCTA CAGTGAAGCA GTCCTGGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGA
 GTTCTGACTC CGTGGAGTTT GGTACIGTAT GGGGAACCTT CGTTGTAGAT GTCACTTGT CAGGACCCCTG ACCTGGTGAC TGTACCTACC GATGGAACCT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

Figura 3A

601 GAGACCAGTG CTGGGCCAGG AAAGAGCCTG CCTGTCTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGCTGTA TGGTGGTTTT TACCATGGCC TATATCATGC
 CTCTGGTCAC GACCCGGTCC TTTCTCGGAC GGACAGAAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACACGACAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTAGC
 179 E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L
 701 TCTGTCCGAA GACATCCCAA CAAGAGCATG TCTACGAAGC AGCCAGGGCA CATGCCAGAG AGGCCAACGA CTCTGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT
 AGACAGCCTT CTGTAGGGTT GTTCTCGTAC AGATGCTTCG TCGGTCCCGT GTACGGTCTC TCCGGTTGCT GAGACCTCTT TGGTACTCCC ACCGGTAGAA
 213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F
 801 CGCAAGTGGC TGCTCCAGTG ATGAGCCAAC TTCCAGAAT CTGGGCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCCAG
 GCGTTCAACG ACGAGGTCAC TACTCGGTTG AAGGGTCTTA GACCGTCTTA TGATGAGACT ACTCGGGACG TATCCTGTCC TCATGGTCTA GTAGCGGGTC
 246 A S G C S S D E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q
 901 ATCAATGGCA ACTACGCCCG CCTGCTGGAC ACAGTTCCTC TGGATTATGA GTTCTGSCC ACTGAGGGCA AAAGTGTCTG TTAATAATGC CCCATTAGGC
 TAGTTACCGT TGATGGGGC GGACGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAAGACCGG TGACTCCCGT TTTCACAGAC AATTTTAAAG GGGTAATCCG
 279 I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O
 1001 CAGGATCTGC TGACATAATC TAGAGTCGAC CTGCAGAACG TTGGCCCGCA TGGCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTACAATA
 GTCCTAGACG ACTGTATTAG ATCTCAGCTG GAGGCTTCG AACGGCGGT ACCGGGTTGA ACAATAACG TCGAATATTA CCAATGTTAT
 ^el inserto termina aqui

Figura 3B

1 GTCCAACTGC ACCTCGGTTT TATCGATTGG AATTGGGCGA CACTGGGCGG ATCTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGACCCA CGGTCGCGAG CAGCAAGAGG
 CAGGTTGACG TGGAGCCAAG ATAGCTAAGC TTAAGCGGGT GTGACCGGGC TAGGAGATCT CTAGGGAGCT GGAGCTGGGT GCGCAGGCTC GTCGTTCTCC

101 ATGGAAGGAT GAATAGAAGT AGCTTCAAAT AGGATGGAGA TCTCATCAGG CTTCGTGTTT CTGGGCCACC TAATAGTGCT CACCTATGGC CACCCACCC
 TACCTTCCTA CTTATCTTCA TCGAAGTTTA TCTACCTCT AGAGTAGTCC GAACGACAAG GACCCGGTGG ATTATCAGCA GTGGATACCG GTGGGGTGGG

1 M E I S S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
 ^MET

201 TAAAAACACC TGAGAGTGTG ACAGGGACCT GGAAGGAGA TGTGAAGATT CAGTGCATCT ATGATCCCT GAGAGGCTAC AGGCAAGTTT TGGTGAATG
 ATTTTGTGG ACTCTCACAC TGTCCTGGA CCTTCTCT ACACCTCTAA GTCACGTAGA TACTAGGGA CTCTCGATG TCCGTTCAAA ACCACTTTAC

24 K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GCTGGTAAGA CAGGGCTCTG ACTCGGTCAC CATCTTCTA CGTGAATCCA CTGGAGACCA TATCCAGCAG GCAAAGTACA GAGGCCGCT GAAAGTGAGC
 CGACCATCT GTGCCGAGAC TGAGGCAGTG GTAGAAGGAT GCACCTCTGGT GACCTCTGGT ATAGGTGTC CGTTTCATGT CTCGGCGGGA CTTTCACTCG

57 L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CACAAAGTTC CAGGAGATGT GTCCCTCCAA ATAAATACCC TCGAGATGGA TGACAGGAAT CACTATACAT GTGAGGTCAC CTGGCAGACT CCGATGGAA
 GTGTTTCAAG GTCTCTACA CAGGGAGGTT TATTTATGGG ACGTGACCT ACTGTCTTA GTGATATGTA CACTCCAGTG GACCGTCTGA GGACTACCTT

90 H K V P G D V S L Q I N T L Q M D D R N H Y T C E V T W Q T P D G N

Figura 4A

501 ACCAAGTAAT AAGAGATAAG ATCATTGAGC TCGGTGTTGG GAAATATAAT CCACCTAGAA TCAATACTGA AGCACCTACA ACCCTGCACCT CCTCTTTGGA
 TGGTTCAITTA TTCTCTAATC TAGTAACCTG AGGCACAAGC CTTTATATTA GGTGATCTT AGTTATGACT TCGTGGATGT TGGGACCGTGA GGAGAAACCT
 124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E

 601 AGCAACAACCT ATAATGAGTT CAACCTCTGA CTTGACCACT AATGGGACTG GAAAACCTGA GGAGACCAT TCTGGTTTCAG GGAGGAAACCT GCCAATCTTT
 TCGTTGTTGA TATTACTCAA GTTGGAGACT GAACTGGTGA TTACCTGAC CTTTGAACCT CCTCTGGTAA CGACCAAGTC CCTCTTTGGA CGGTTAGAAA
 157 A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F

 701 GCCATAATCT TCATCATCTC CCTTTGCTGC ATAGTAGCTG TCACCATAAC TTATATCTTG TTCGGCTGCA GGACATTCCA ACAAGAGTAT GTCTATGGAG
 CGGTATTAGA AGTAGTAGAG GGAACGACG TATCATCGAC AGTGGTATGG AATATAGAAC AAGGCGACGT CCTGTAAGGT TGTCTCATA CAGATACCTC
 190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q Q E Y V Y G V

 801 TGAGCAGGT GTTTGCCAGG AAGACAAGCA ACTCTGAAGA AACACAAGG GTGACTACCA TCGCAACTGA TGAACCAGAT TCCCAGGCTC TGATTAGTGA
 ACTGTCOCA CAAACGGTCC TTCTGTTCGT TGAGACTTCT TTGGTGTCC CACTGAIGGT AGCGTTGACT ACTTGGTCTA AGGGTCGGAG ACTAATCACT
 224 S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T D E P D S Q A L I S D

 901 CTACTCTGAT GATCCTTGCC TCAGCCAGGA GTACCAATA ACCATCAGAT CAACAATGTC TATTCCTGCC TGCTGAACAC AGTTTCCAGA AACTAAGAAG
 GATGAGACTA CTAGGAACGG AGTCGGTCT CATGGTTTAT TGGTAGTCTA GTTGTACAG-ATAAGGACGG ACGACTTGTG TCAAAGGTCT TTGATTCTTC
 257 Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O

 1001 TTCTTGCTAC TGAAGAAAT AACATCTGCT AAAATGCCCC TACTAAGTCA AGGTCTACTG GCGTAATTAC CTGTACTTCA TTTACTACTT GCCTTCAACA
 AAGAACGATG ACTTCTTTTA TTGTAGACGA TTTTACGGGG ATGATTCACT TCCAGATGAC CGCATTAAATG GACAATGAAT AAATGATGAA CGGAAGTTGT

Figura 4B

```

1101 TAGCTTTCTC CCTGGCTTCC TTTCTTCTTA GACAACTTAA AGTATCTATC TAGTCTGACA ATTCTGGGGC CATTGAGAAA TCCTGGGTTT GGCTAAGAAT
    ATCGAAAGAG GGACCGAAGG AAAGAAGAAAT CTGTTGGATT TCATAGATAG ATCAGACGGT TAAGACCCCG GTAACCTTTT AGGAOCCAAA CCGATTCTTA

1201 ATACTACATG CACCTCAAGA AATCTAGCTT CTGGGCTTCA CCCAGAACAA TTTTCTTCTT AGGGCCTTCA CAACTCTTCT CCAAACAGCA GAGAAATTCC
    TATGATGTAC GTGGAGTTCT TTAGATCGAA GACCCGAAGT GGGTCTTGTT AAAAGAAGGA TCCCGGAAGT GTTGAGAAGA GGTTTGCGT CTCTTTAAGG

1301 ATAGCAGTAG AGGTTCTTTA TCATGCCCTCC AGACAGCGTG AGTCTCAGTC CTACAAACTC AGACAAGCAC ATGGGTCTAG GATTACTCCT CTTTCTCTAG
    TATCGTCATC TCCAAGAAAT AGTACGGAGG TCTGTGCCAC TCAGATCAG GATGTTTGAG TCTGTTCGTG TACCCAGATC CTAATGAGGA GAAAGAGATC

1401 GCCCAGATGA CTTTAAATTG ATATTACTAT TGTACATTA TGAATCTAAT GGACATGTAT TCTTTTGTG TTAATAAATG TTTAATCATG ACATCAAAAA
    CCGGCTACT GAAAATTAAC TATAATGATA ACGATGTAAT ACTTAGATTA CGTGTACATA AGAAACAAC AATTATTTAC AAATTAGTAC TGTAGTTTTT

1501 AAAAAAAAAA AAGGGCGGCC GCGACTCTAG AGTCGACCTG CAGTAGGGAT AACAGGGTAA TAAGCTTGGC CGCCATGGCC CAACTTGTTT
    TTTTTTTTTT TTCCCGCCCG CGCTGAGATC TCAGCTGGAC GTCATCCCTA TTGTCCCAT ATTGGAACCG GCGGTACCGG GTTGAACAAA

```

^pRK5 continúa aquí

Figura 4C

	señal	IgV	
ADN185041	1	M G T I L L G L L L L L G H L T V D T Y G R P I I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T	50
ADN183026	1	M G I L L G L L L L L G H L T V D T Y G R P I I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T	50
ADN220409	1	M E I S S G L L L F L G H L I V L T Y G H P T L K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R	50
ADN185041	51	Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L	100
ADN183026	51	Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L	100
ADN220409	51	Q V L V K W L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y Q G R L K V S H K V P G D V S L Q I	100
ADN185041	101	S T I L E M D D R R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I I T E L R V Q K L S V S K P T V T T G S G	150
ADN183026	101	S T I L E M D D R R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I I T E L R V Q K H - - - - -	138
ADN220409	101	N T I L O M D D R R N H Y T C E V T W Q T P D G N Q V I R D K I I E L R V R K Y - - - - -	138
ADN185041	151	Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P I S Y I W Y K Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L F K P	200
ADN183026	138	- - - - -	138
ADN220409	138	- - - - -	138
ADN185041	201	A V I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T T E A P T T M T Y P	250
ADN183026	139	- - - - -	156
ADN220409	139	- - - - -	154
ADN185041	251	L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L P V F A I T L I S L C C M V V F T	300
ADN183026	157	L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L P V F A I L I S L C C M V V F T	306
ADN220409	155	L E A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F A I F E I S L C C I V A V T	204
ADN185041	301	M A Y I T M L C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T T M R V A I F A S G C S S D E P T S	350
ADN183026	207	M A Y I T M L C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T T M R V A I F A S G C S S D E P T S	256
ADN220409	205	I P Y I L F R C R I F Q Q E Y V Y G V S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T - - - D E P D S	250
ADN185041	351	Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C	399
ADN183026	257	Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C	305
ADN220409	251	Q A L I S D Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S - - - - - T M S I P A C	280

Figura 5

STIgMA murino en el Cr 11

STIgMA humano en el cromosoma X

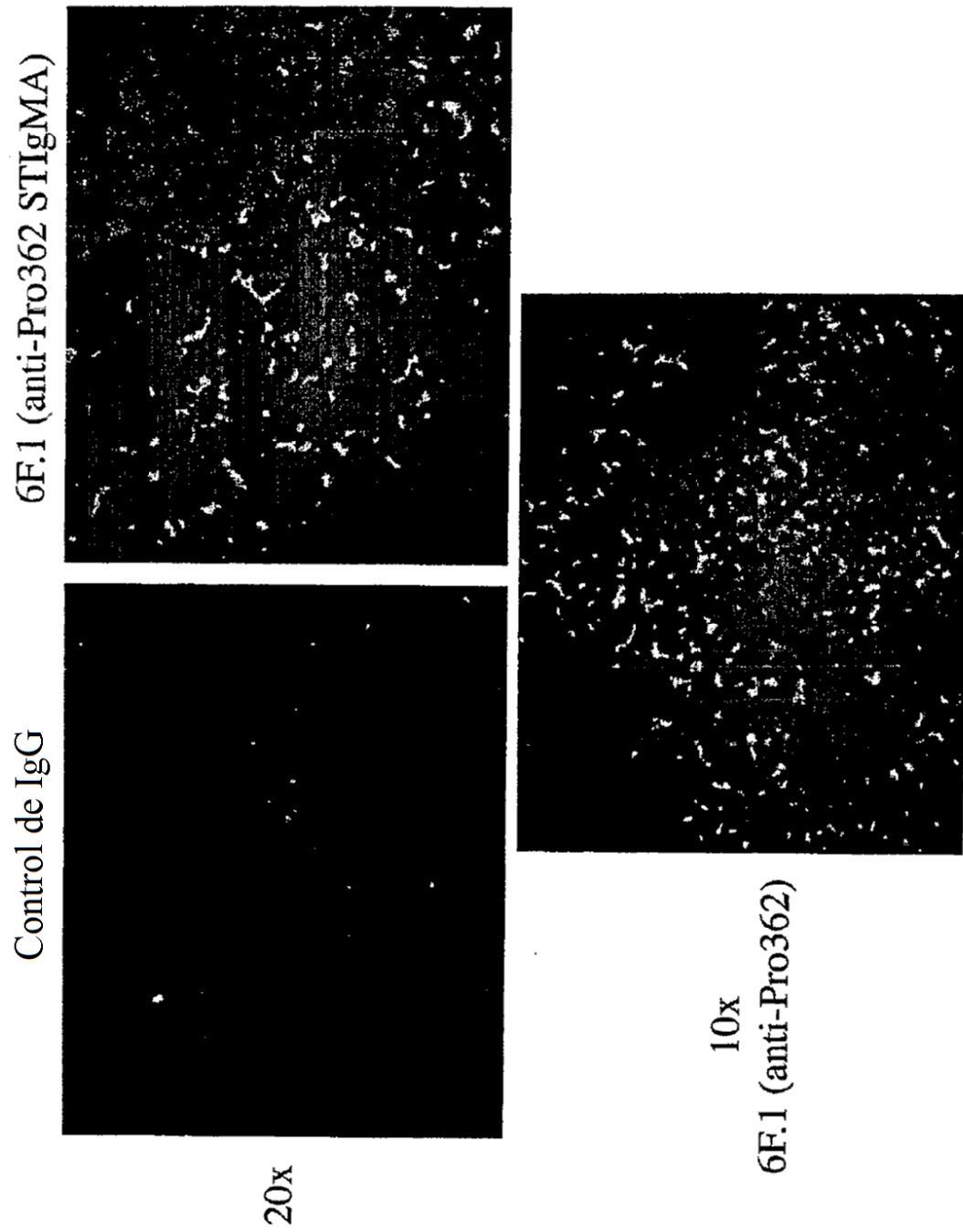


Figura 6

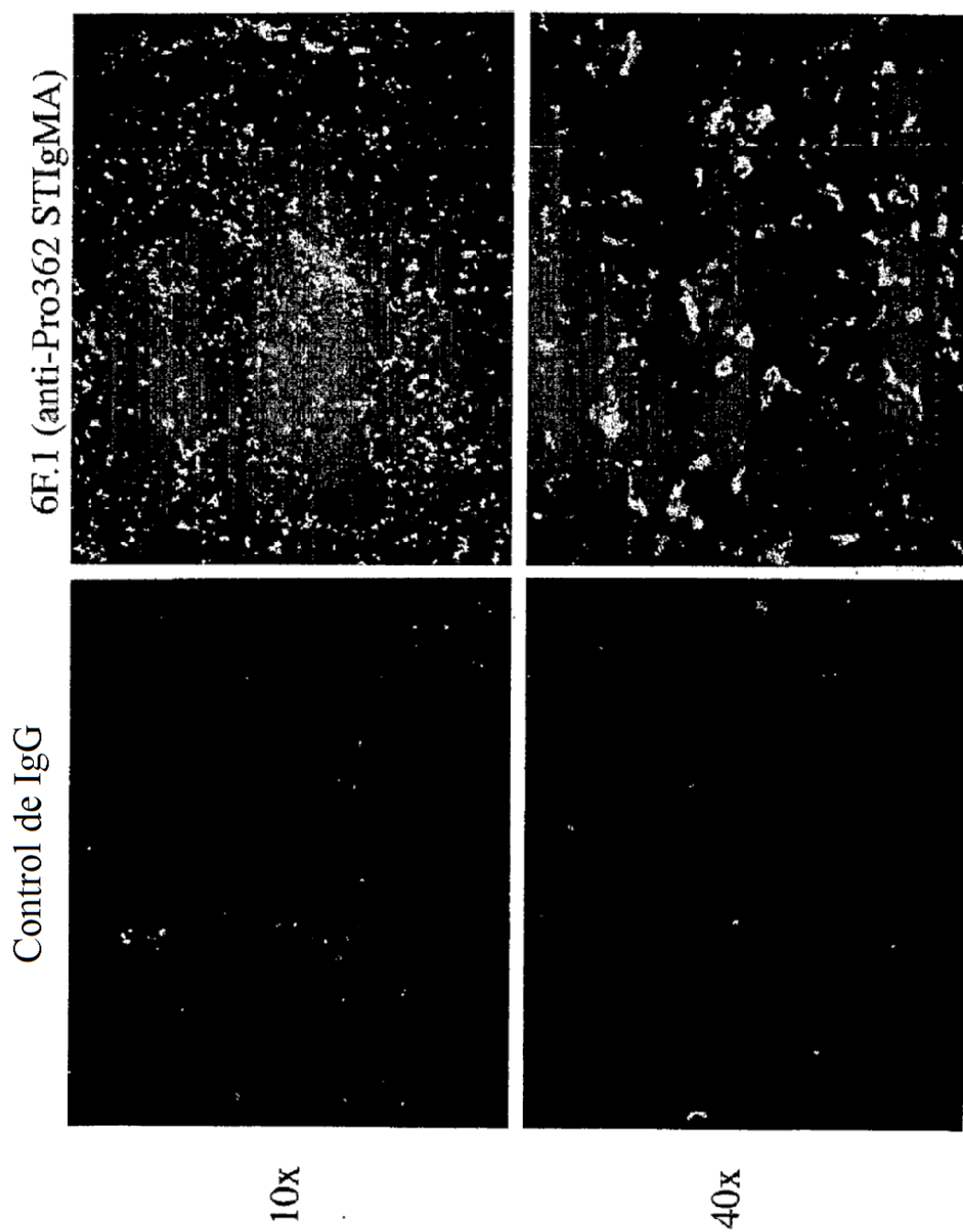


Figura 7

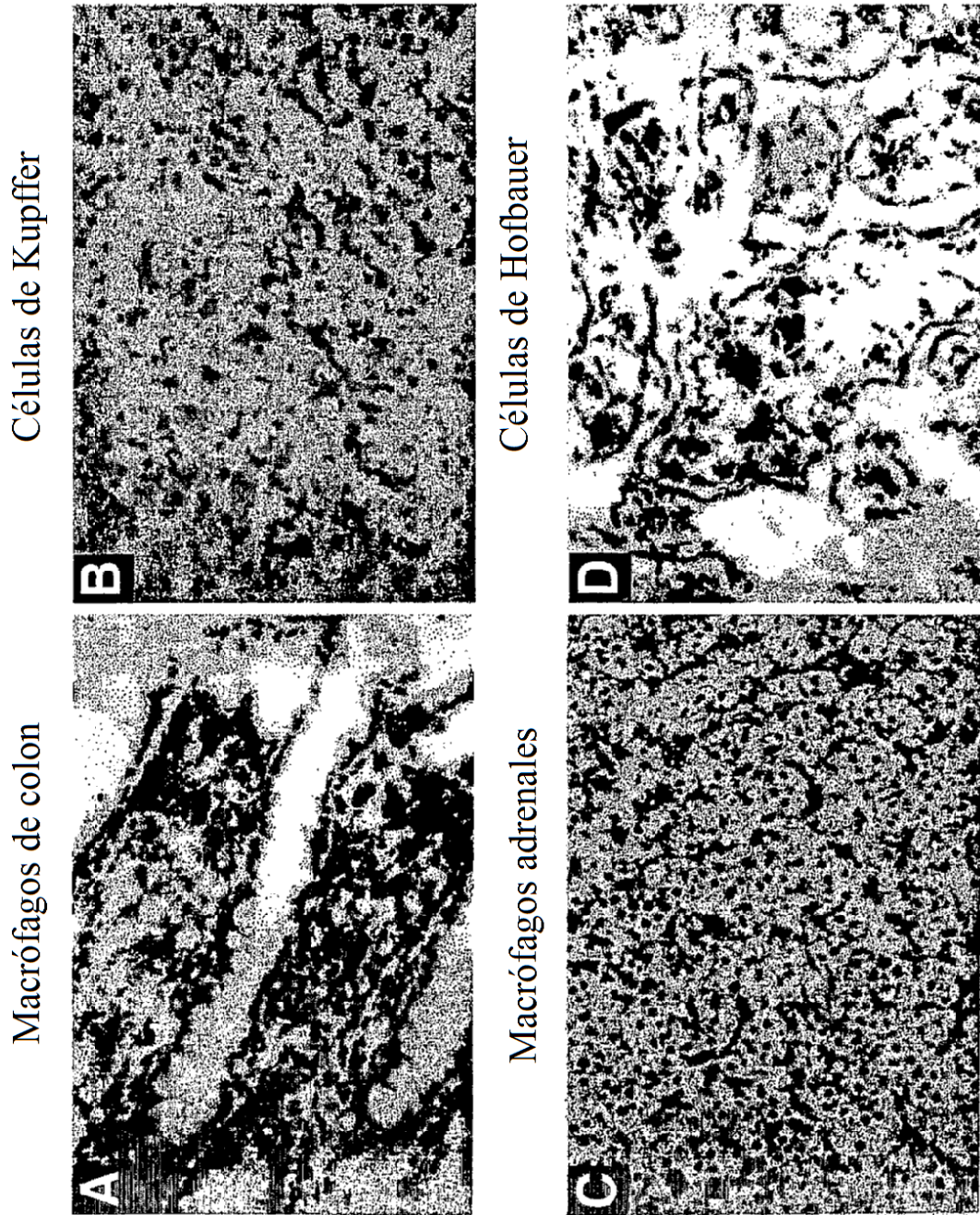


Figura 8

Sinovia de AR

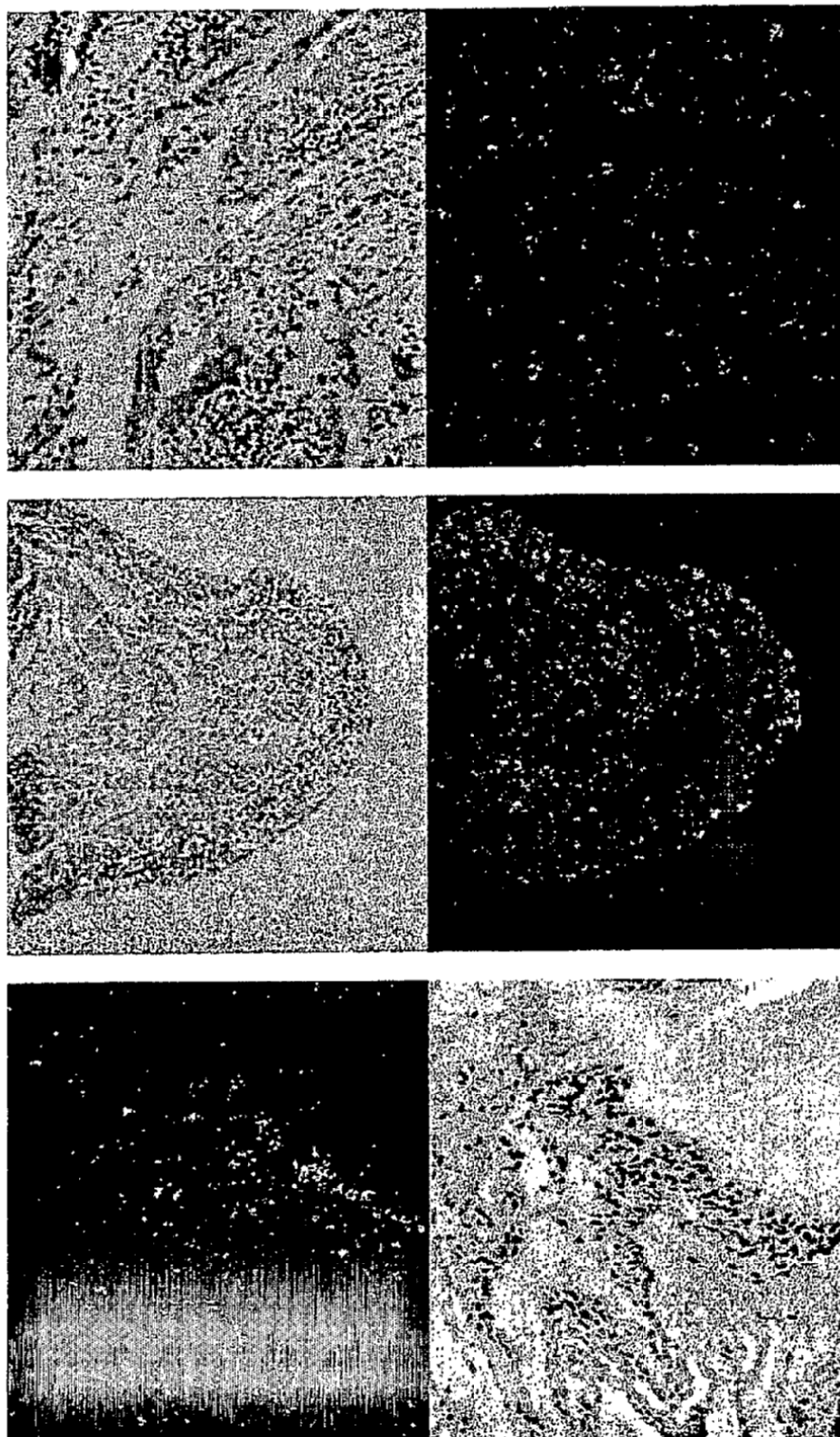


Figura 9

Microglia cerebral

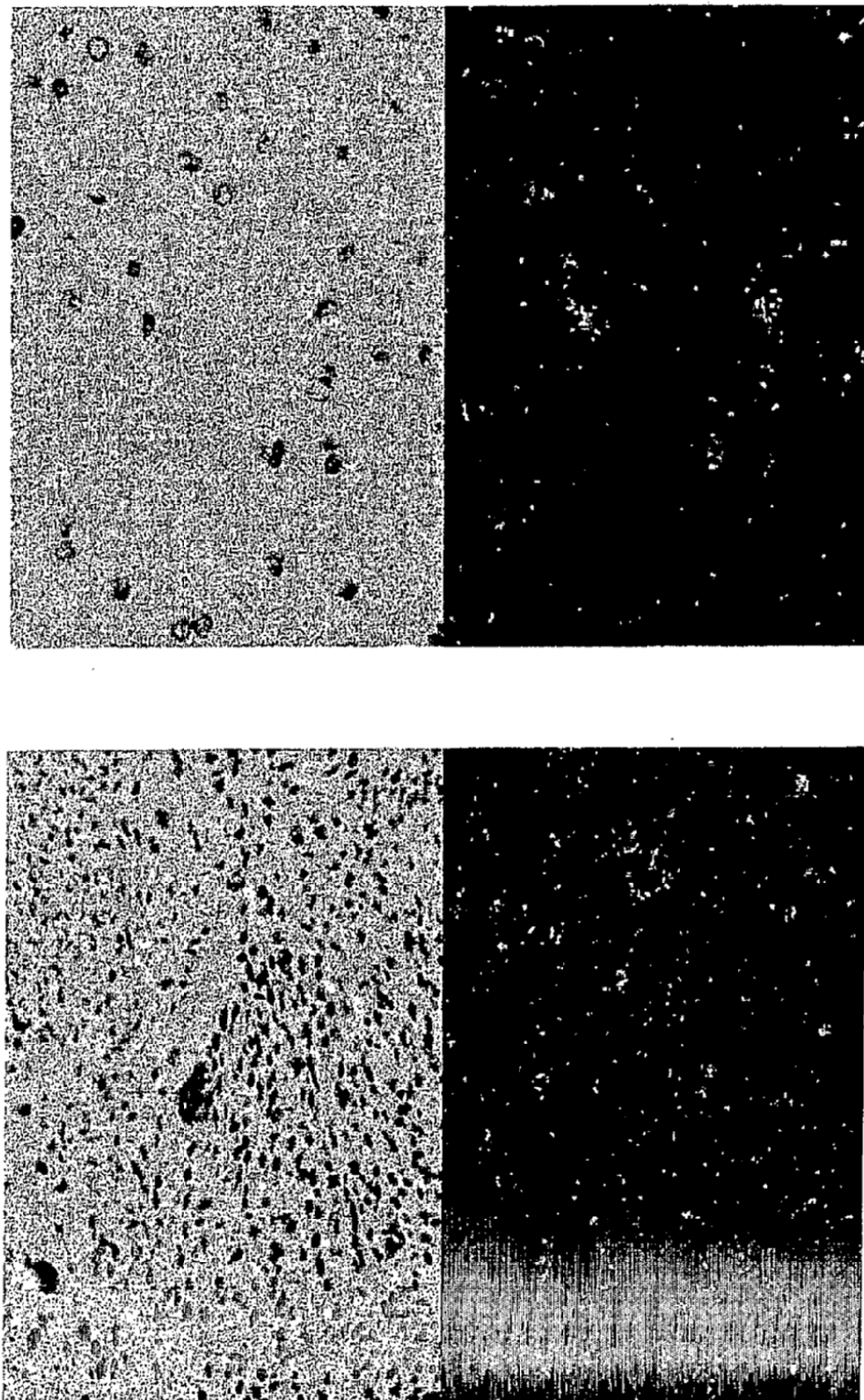


Figura 10

Macrófagos alveolares

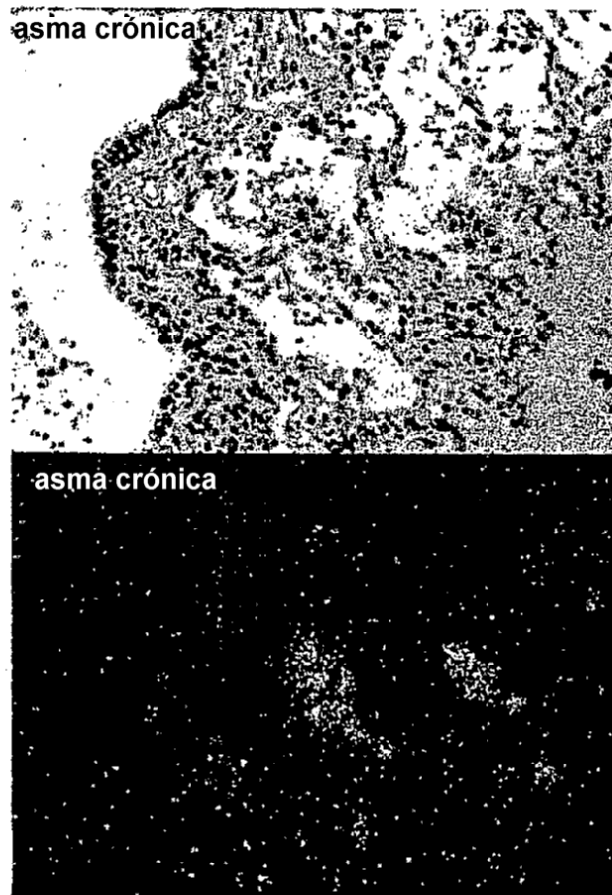


Figura 11

Células de Kupffer hepáticas

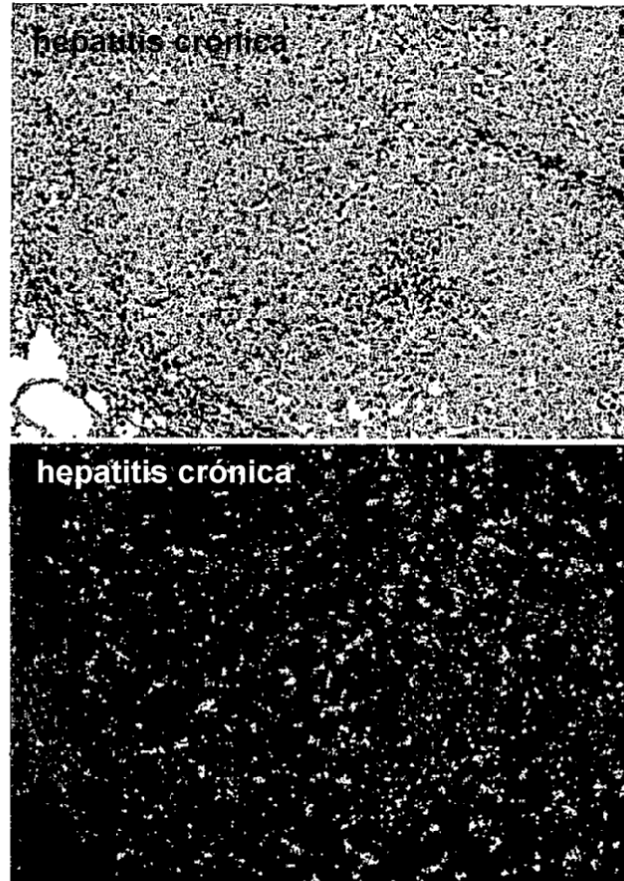
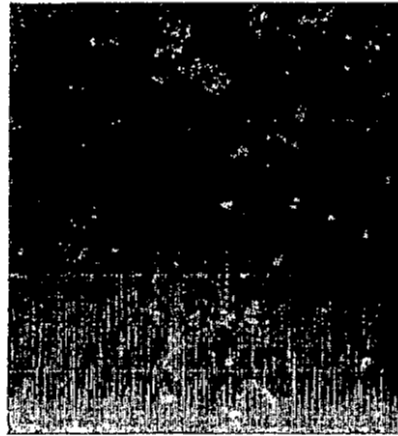


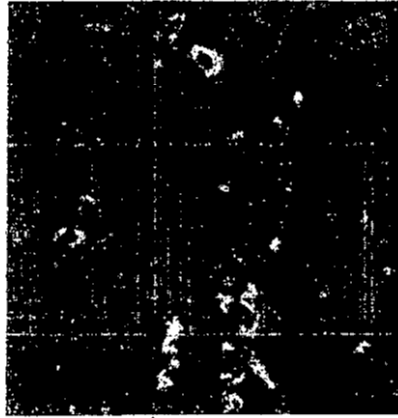
Figura 12

IHC DOBLE DE STIgMA-CD68

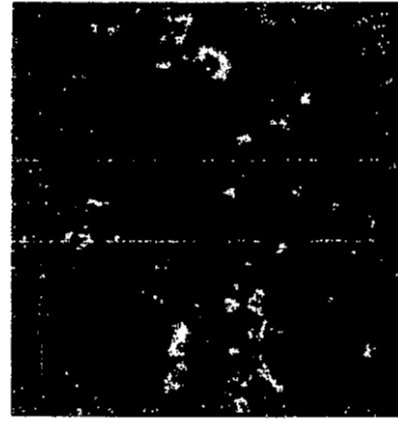
Macrófagos de la glándula adrenal



STIgMA adrenal



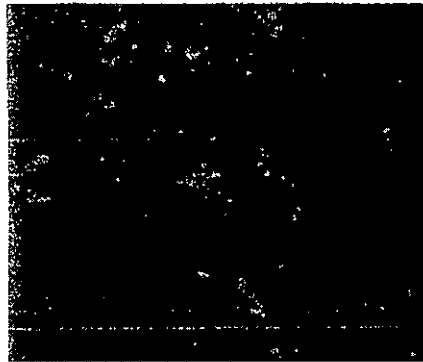
CD68 adrenal



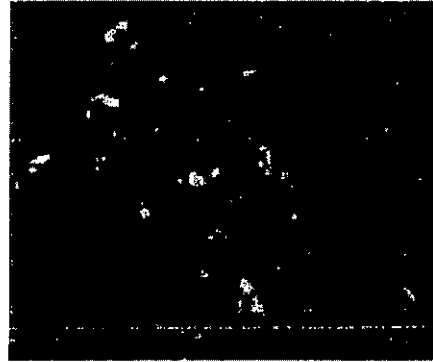
STIgMA/CD68 adrenal

Figura 13

Células de Kupffer hepáticas



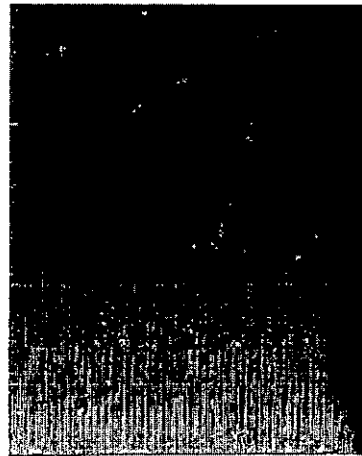
STIgMA hepático



CD68 hepático

Figura 14

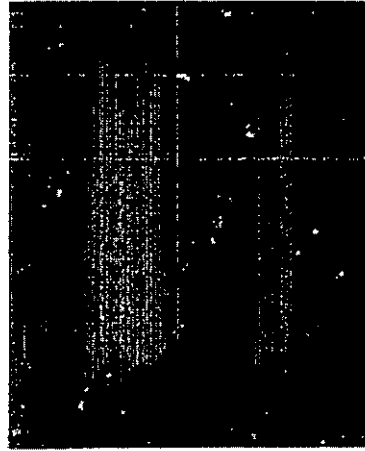
Células de la microglia celular



STIgMA cerebral



CD68 cerebral



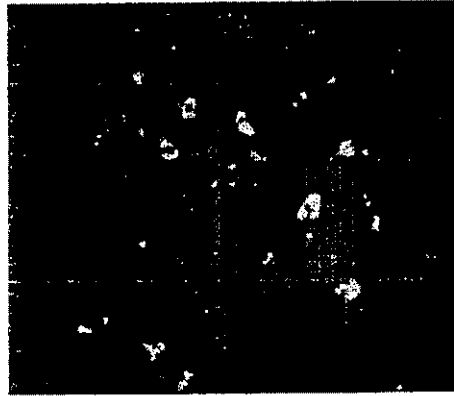
STIgMA/CD68 cerebral

Figura 15

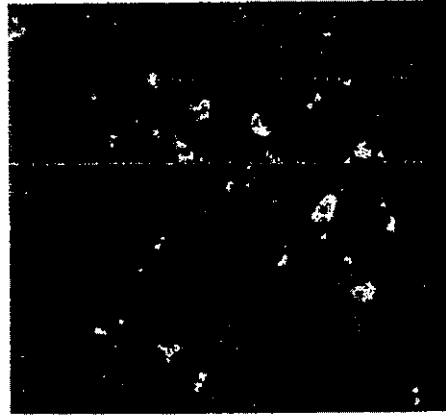
Células de Hofbauer placentarias



STIgMA placentario



CD68 placentario



STIgMA/CD68 placentario

Figura 16

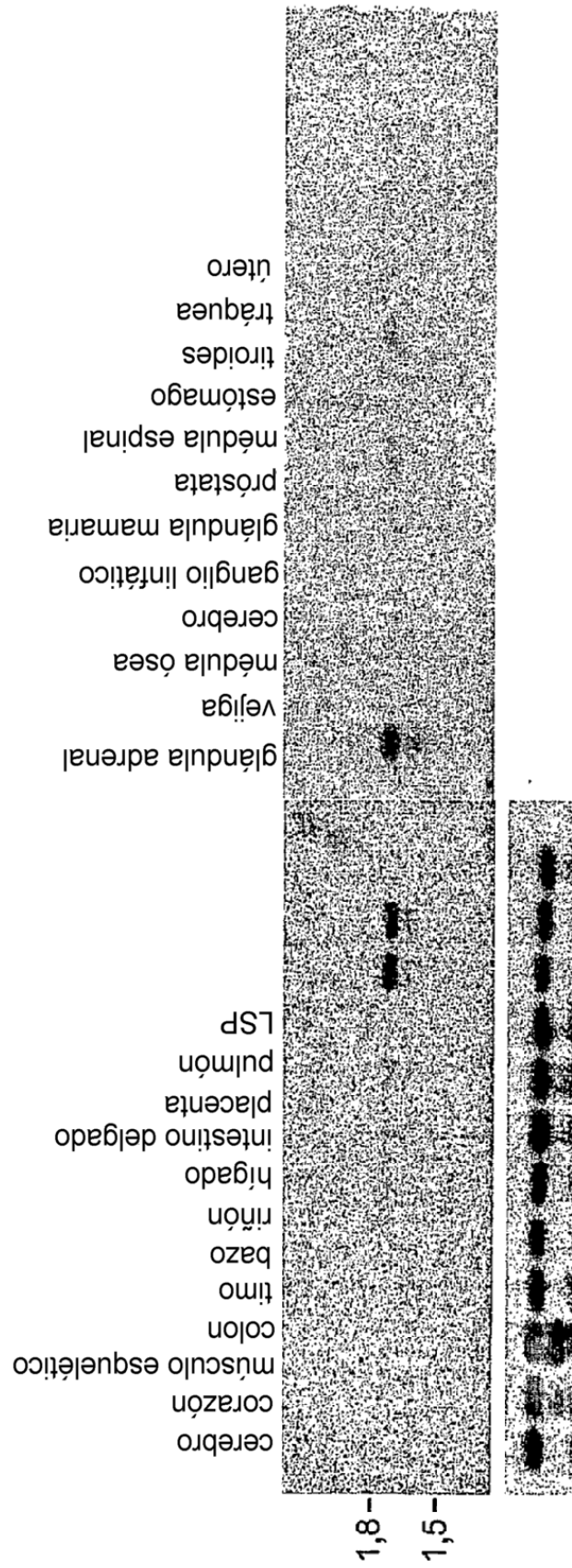


Figura 17

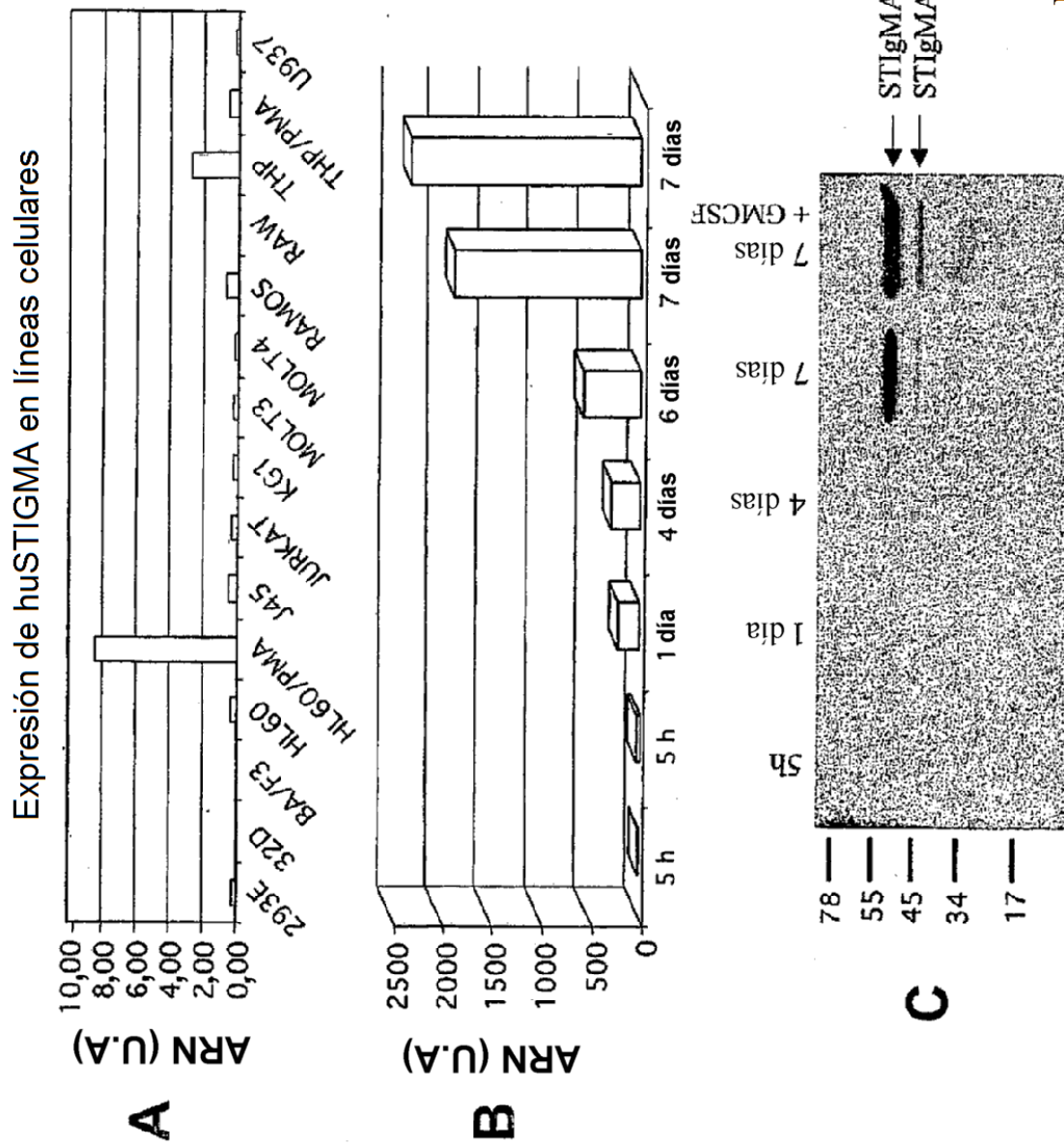


Figura 18

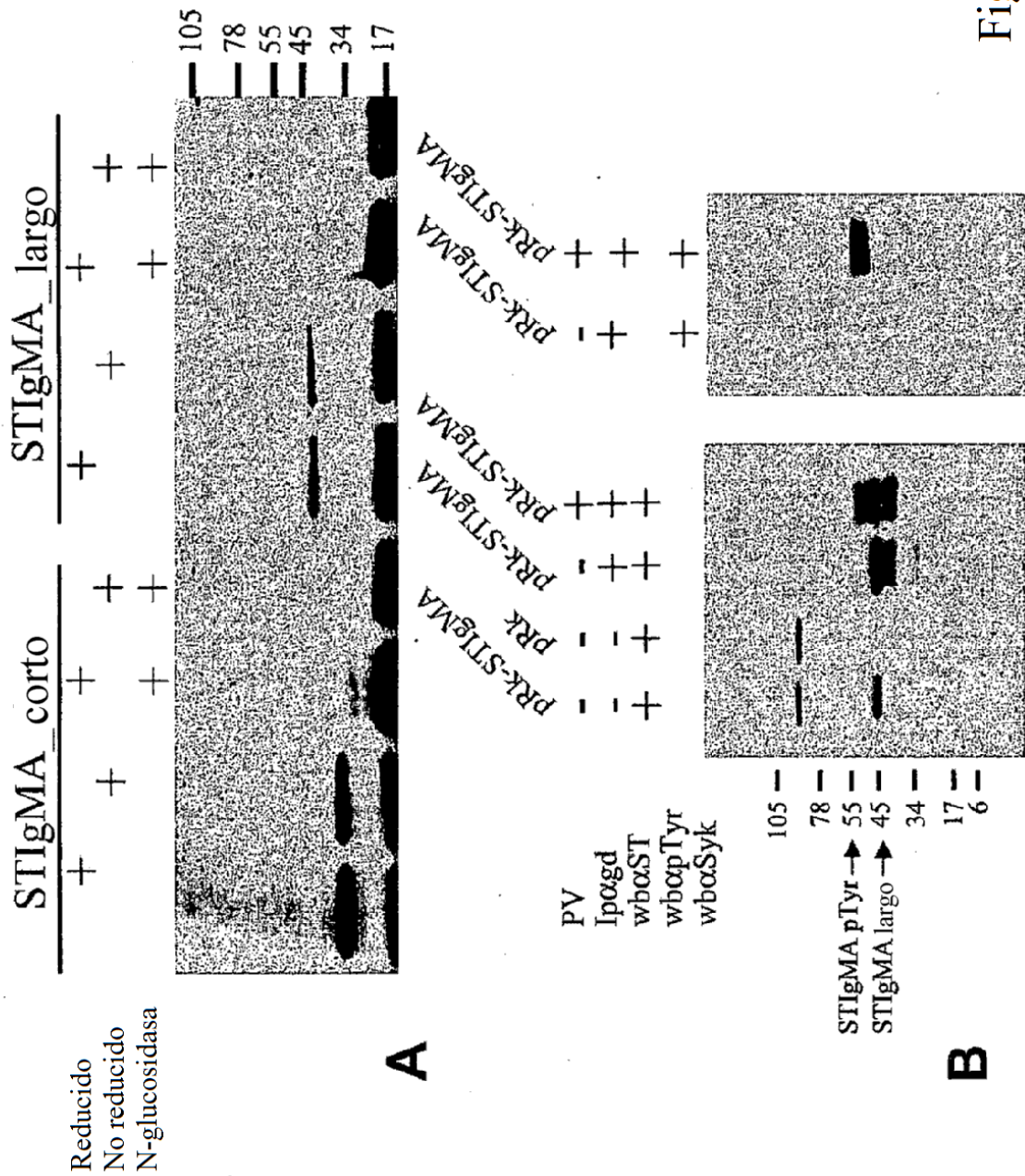


Figura 19

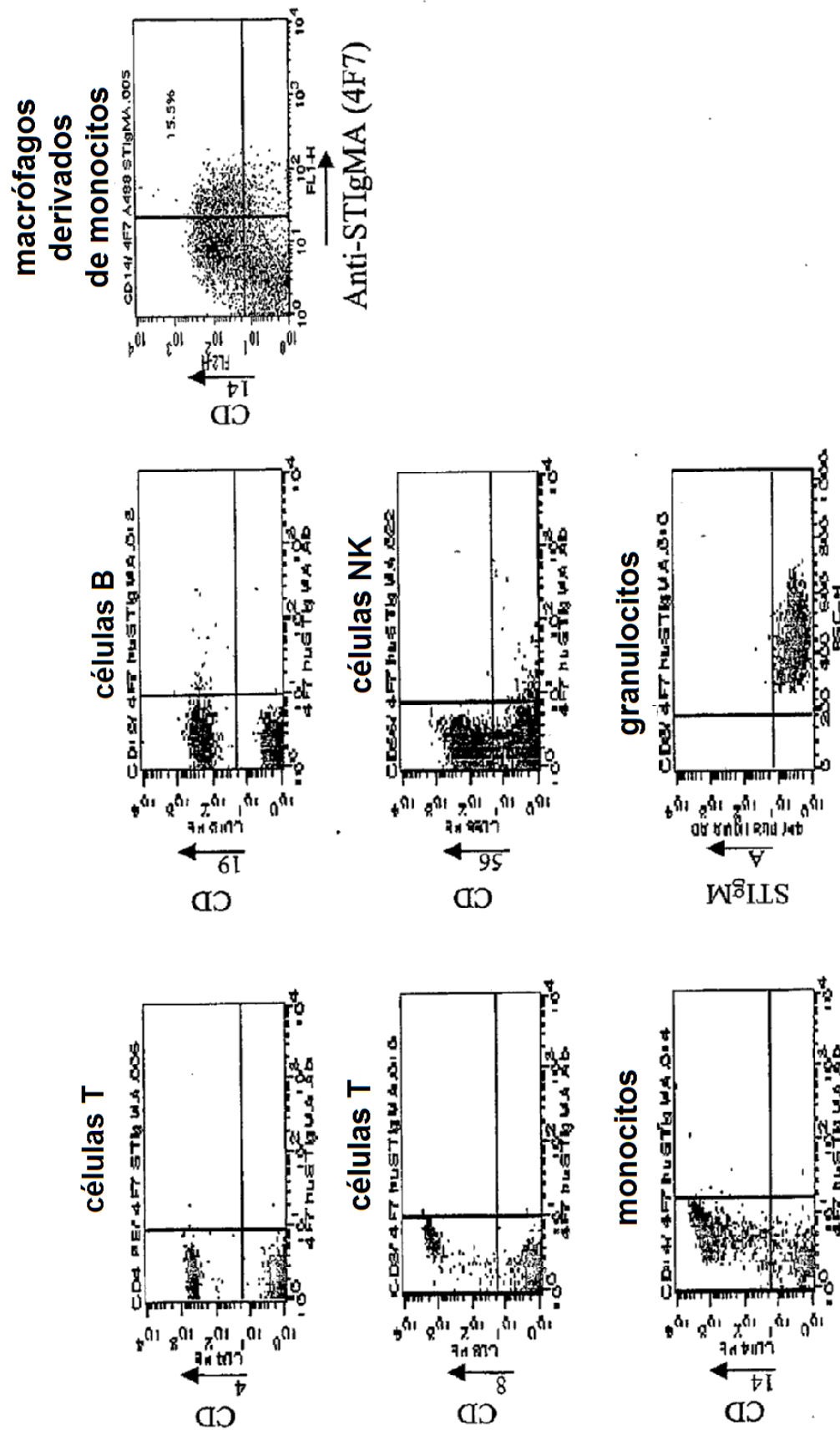


Figura 20



Figura 21A

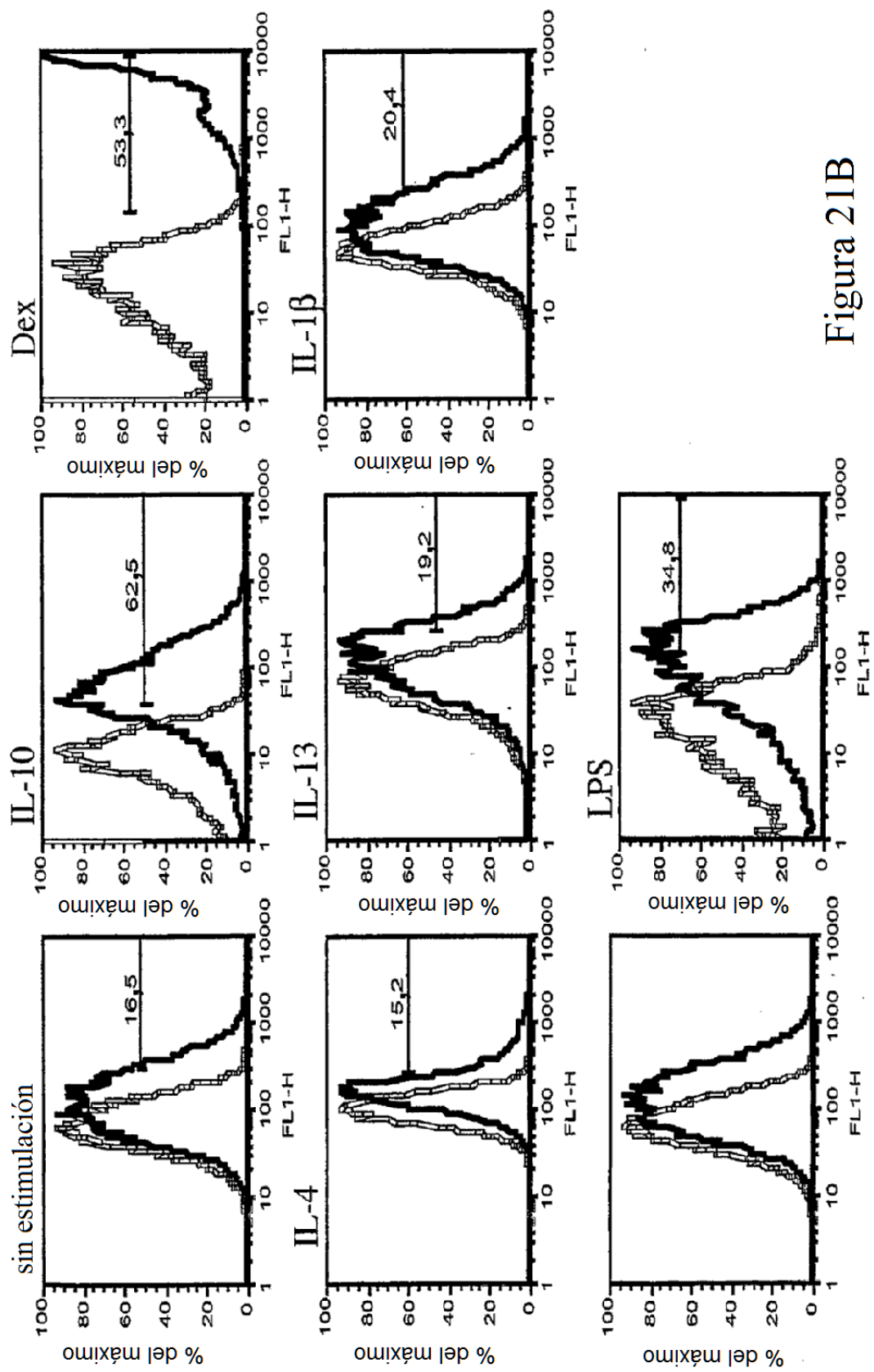


Figura 21B

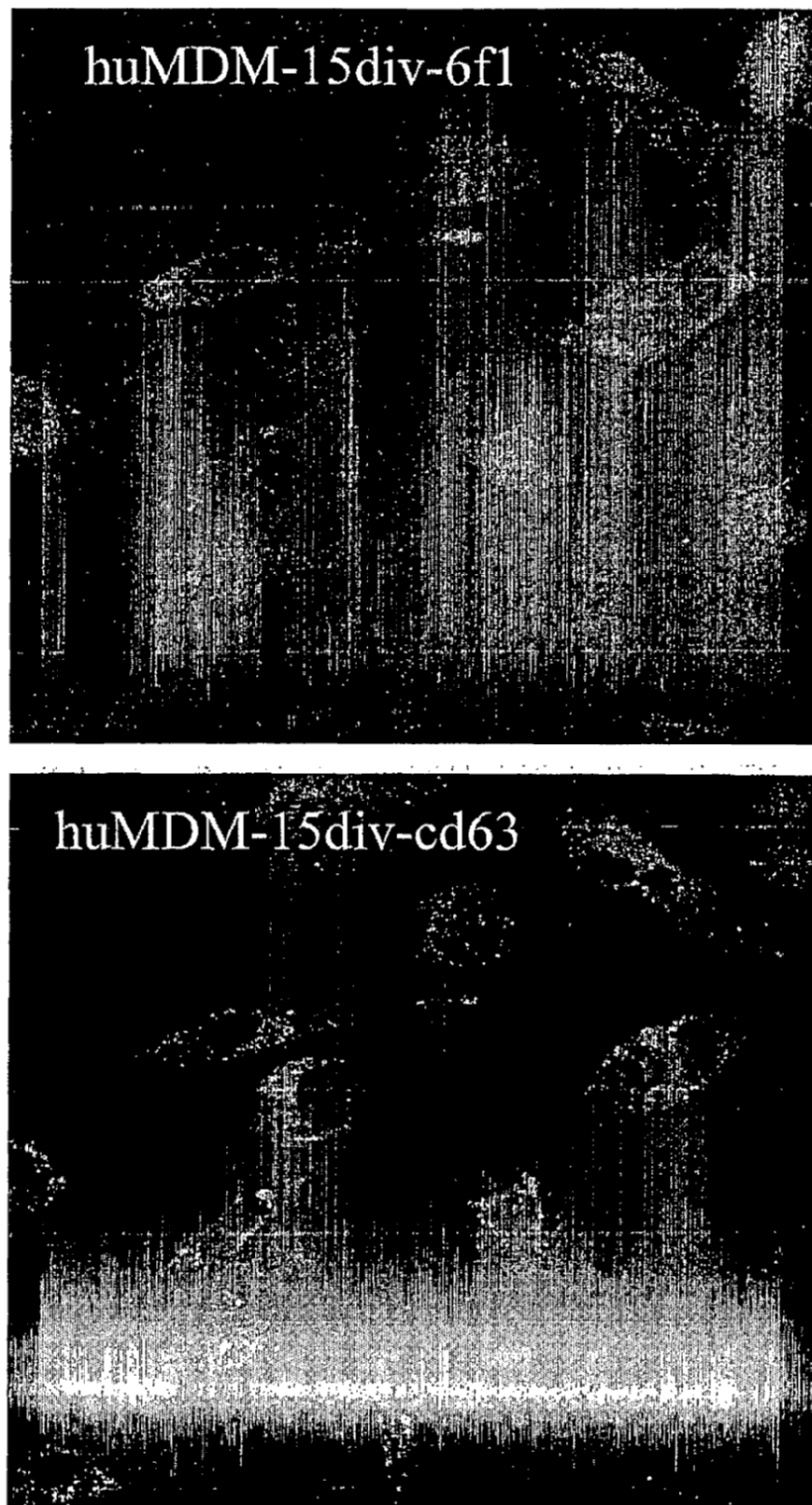


Figura 22

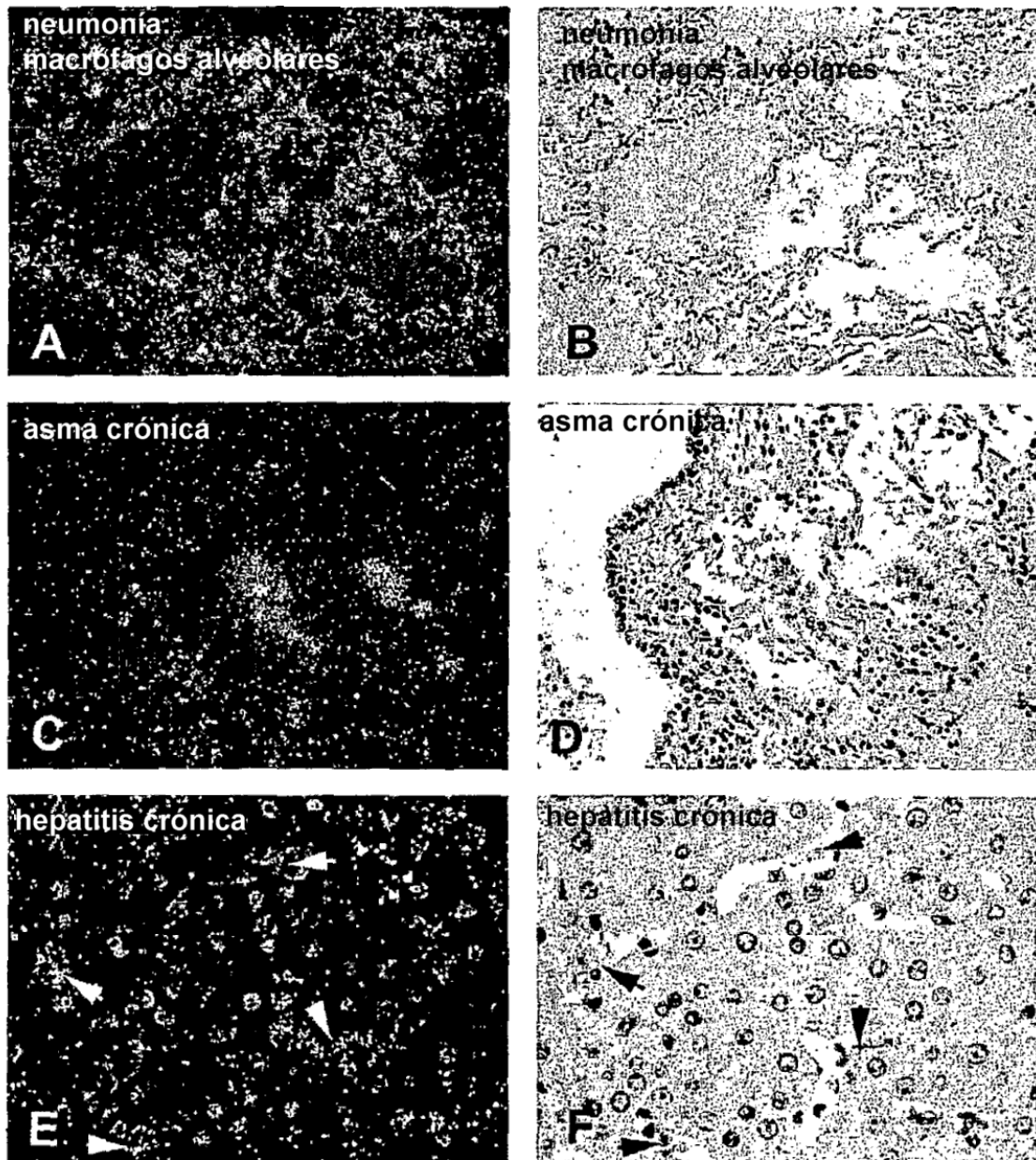


Figura 23

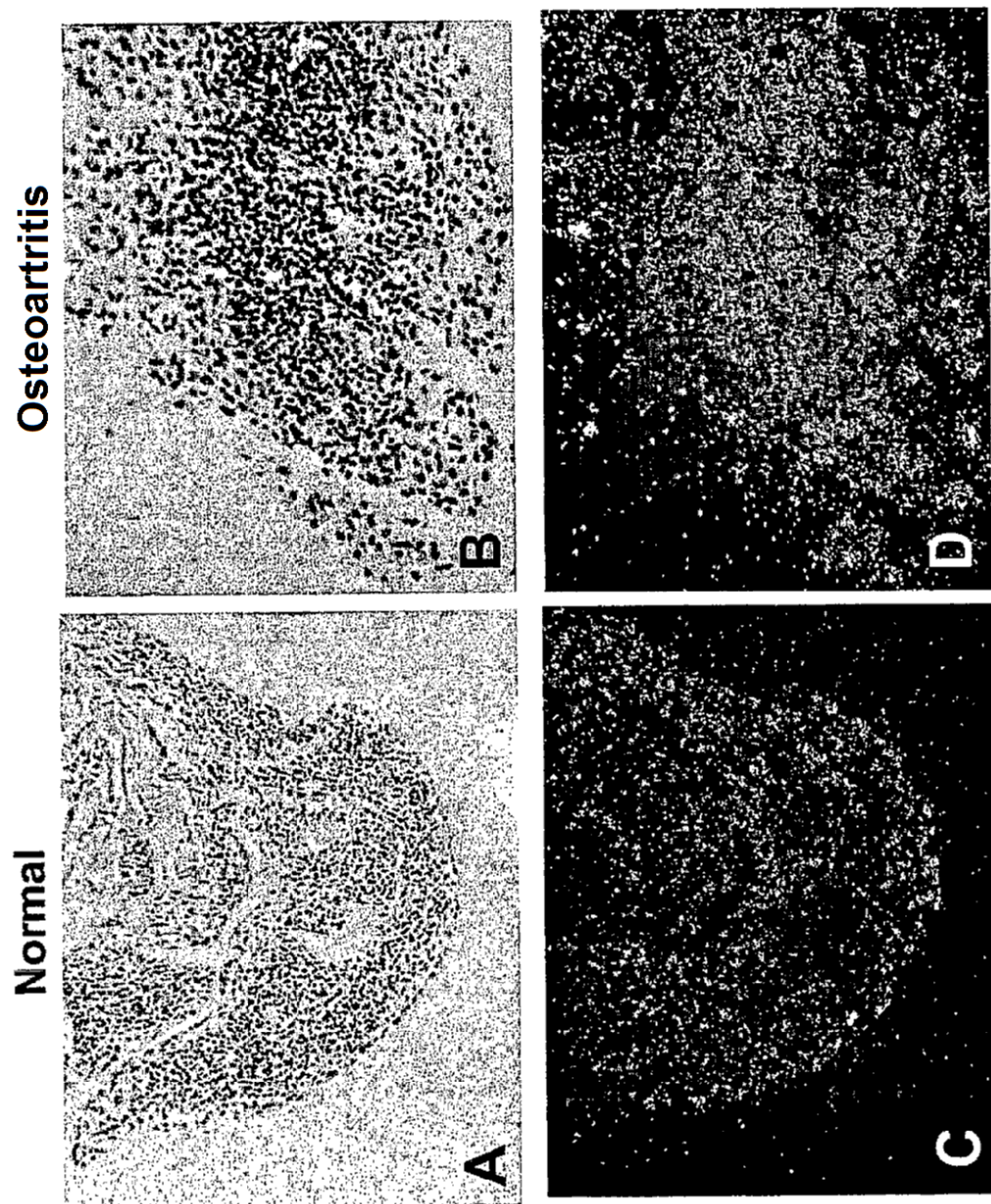


Figura 24

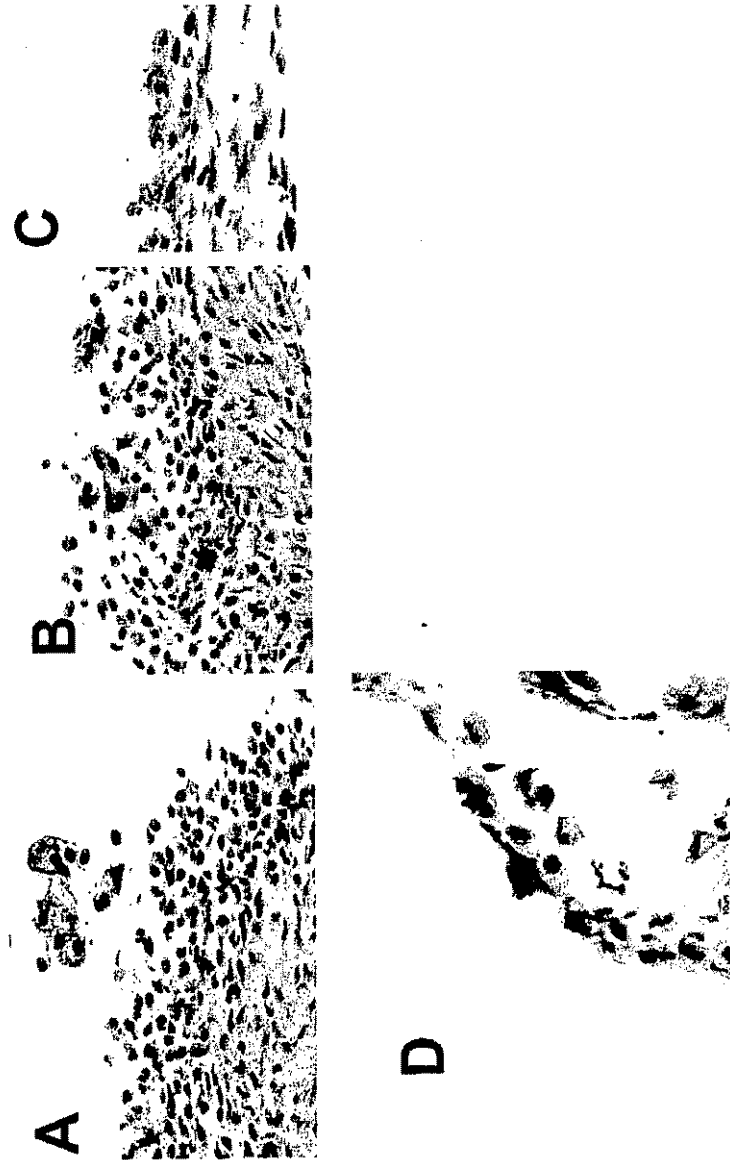


Figura 25

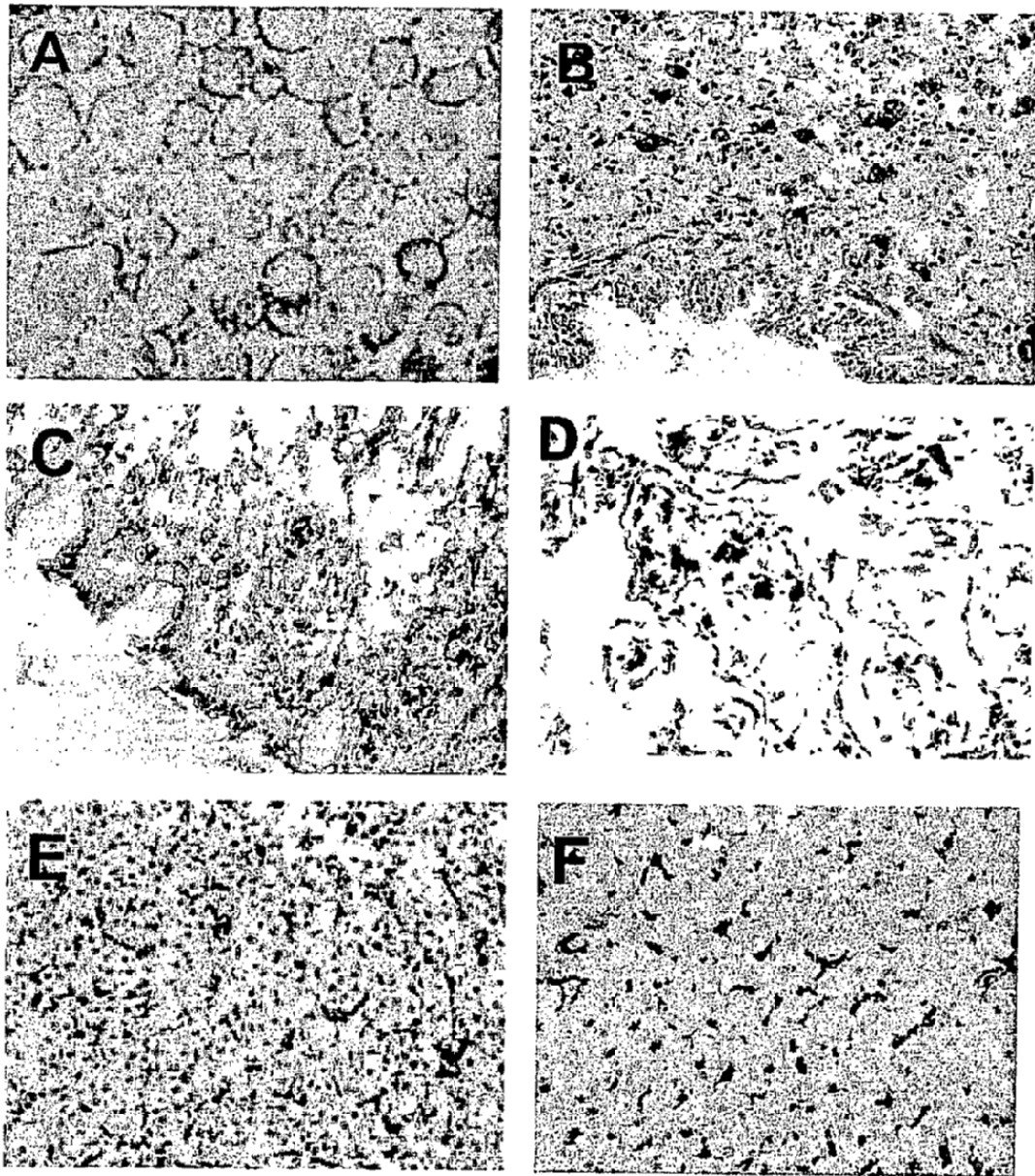


Figura 26

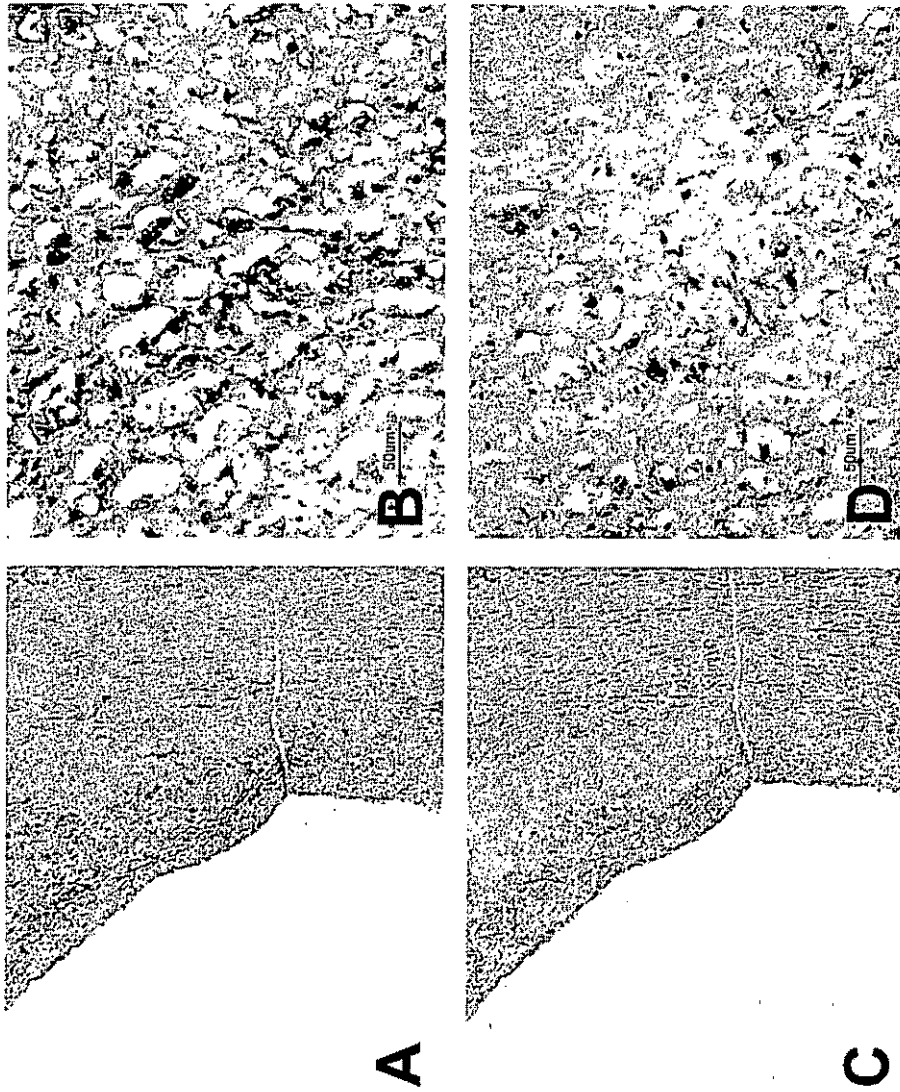


Figure 27

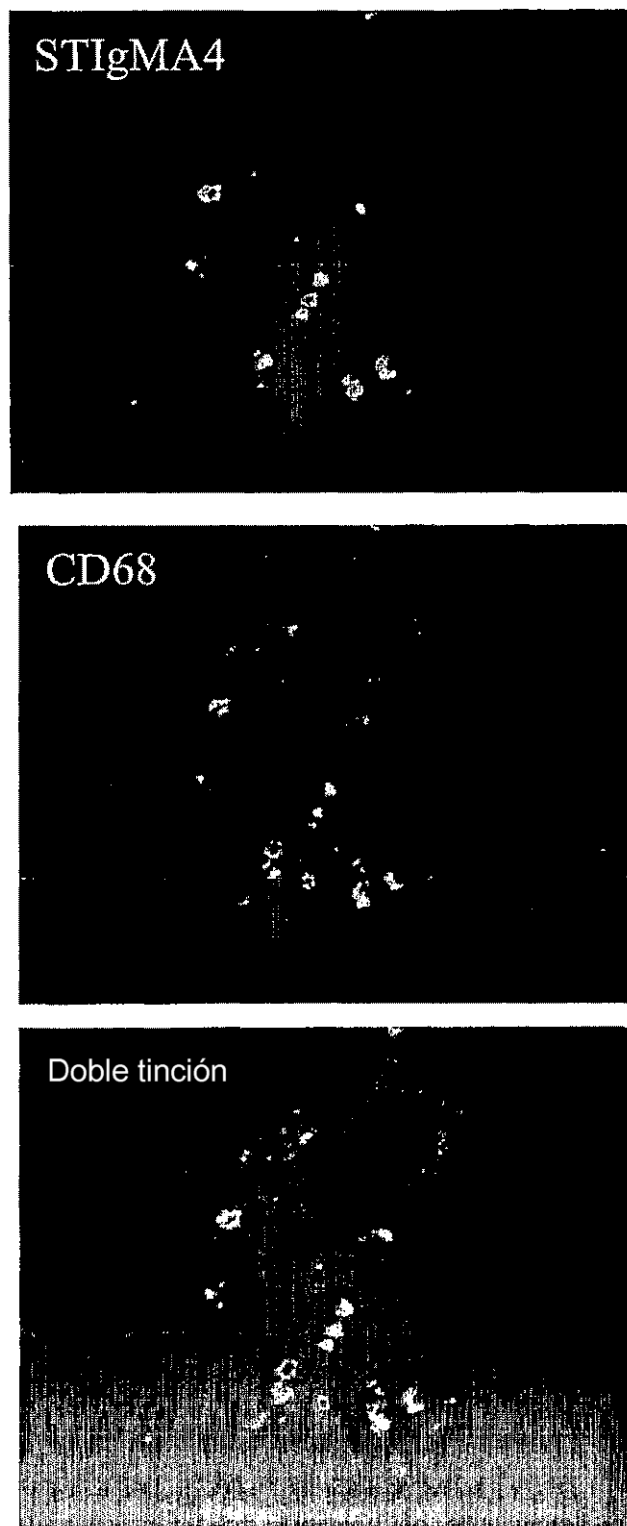


Figura 28

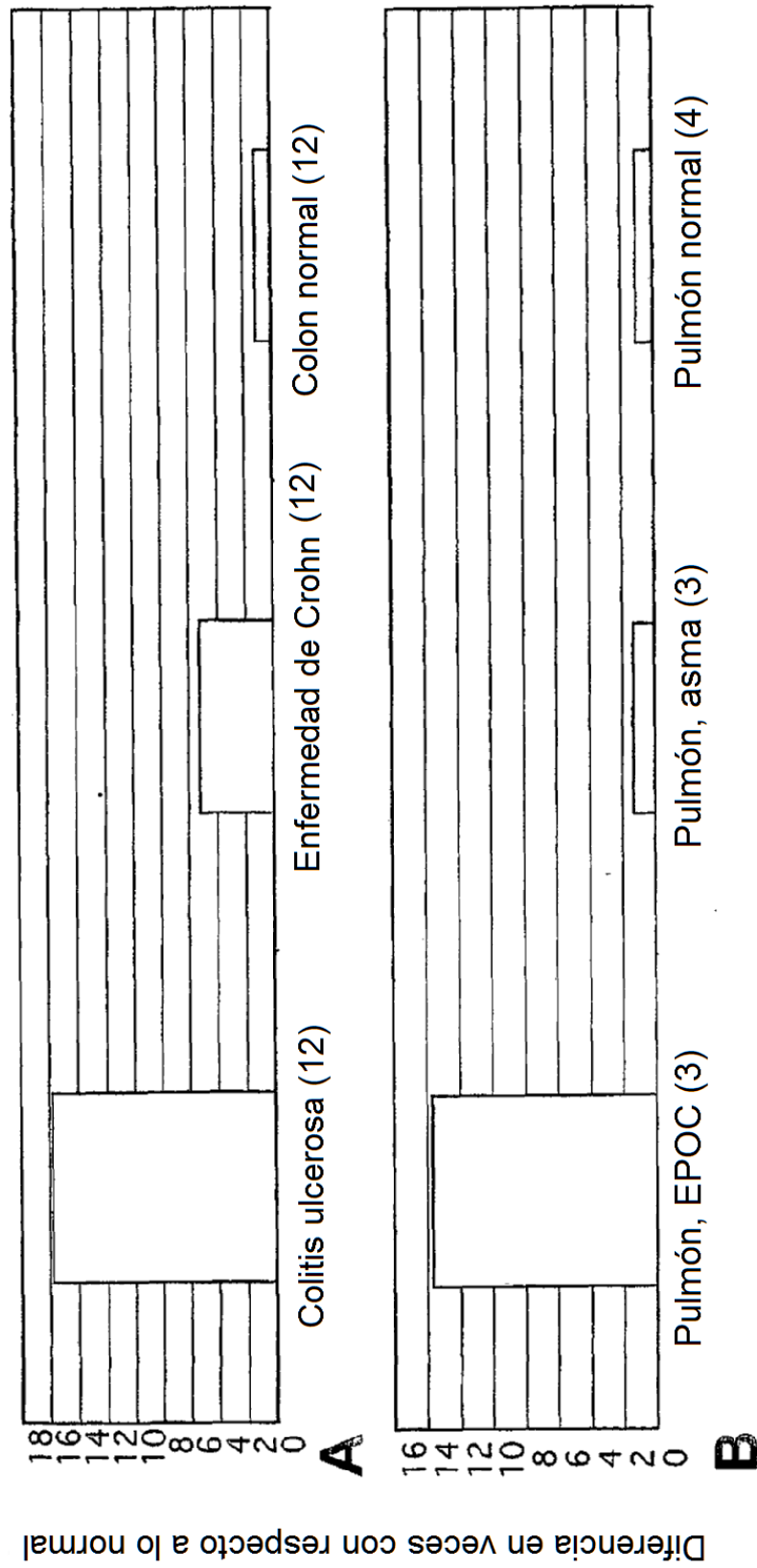


Figura 29

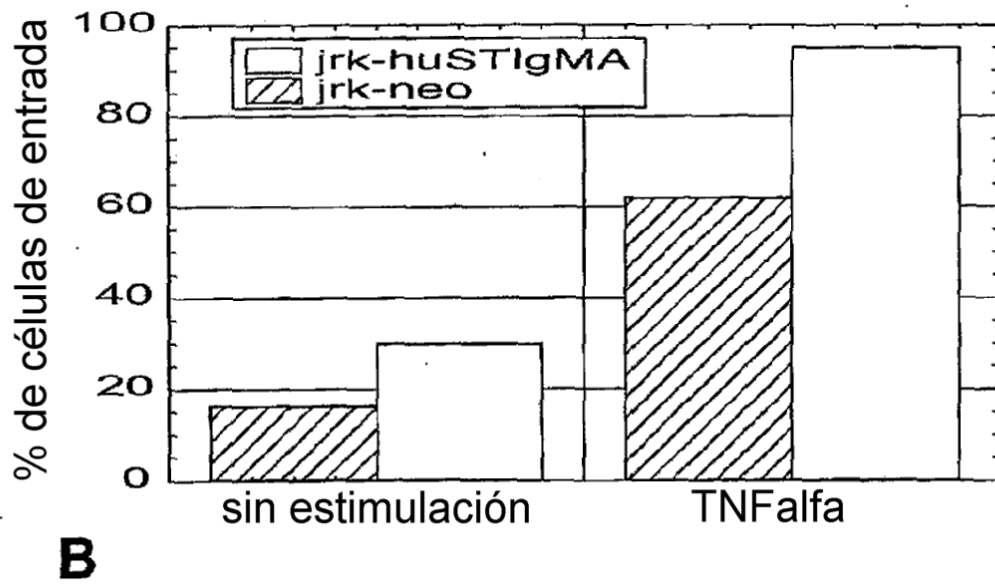
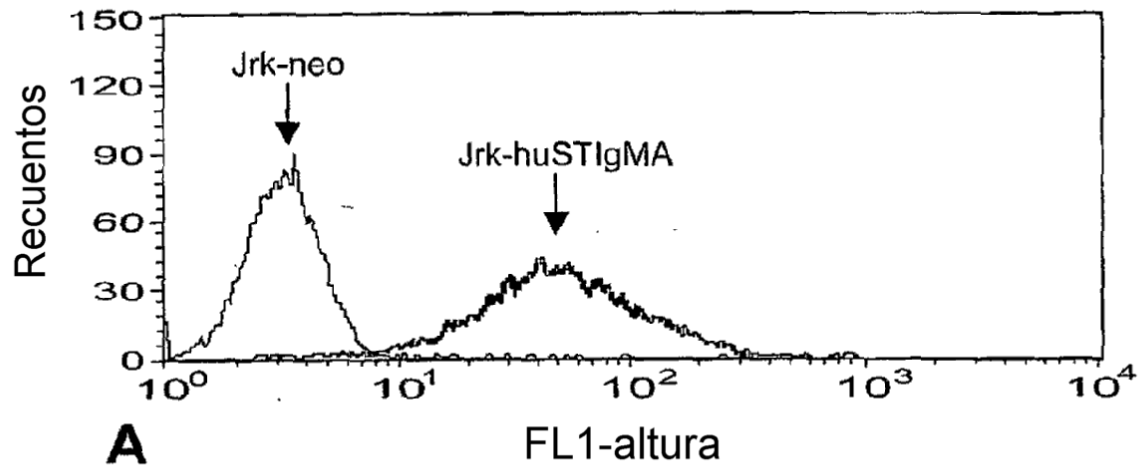


Figura 30

Efecto de la inyección sistémica de muSTIgMA-Fc en la progresión de la AIC

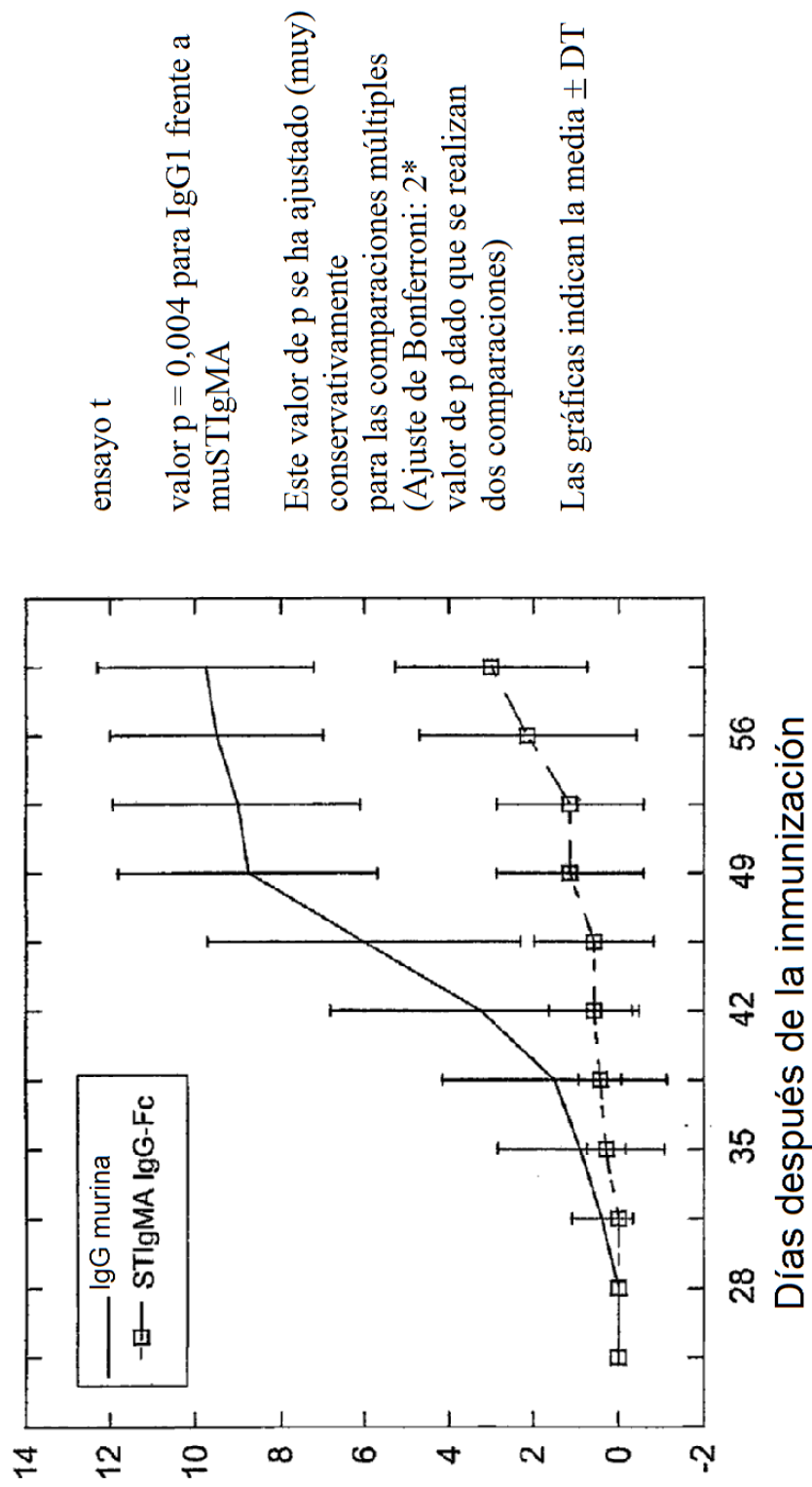
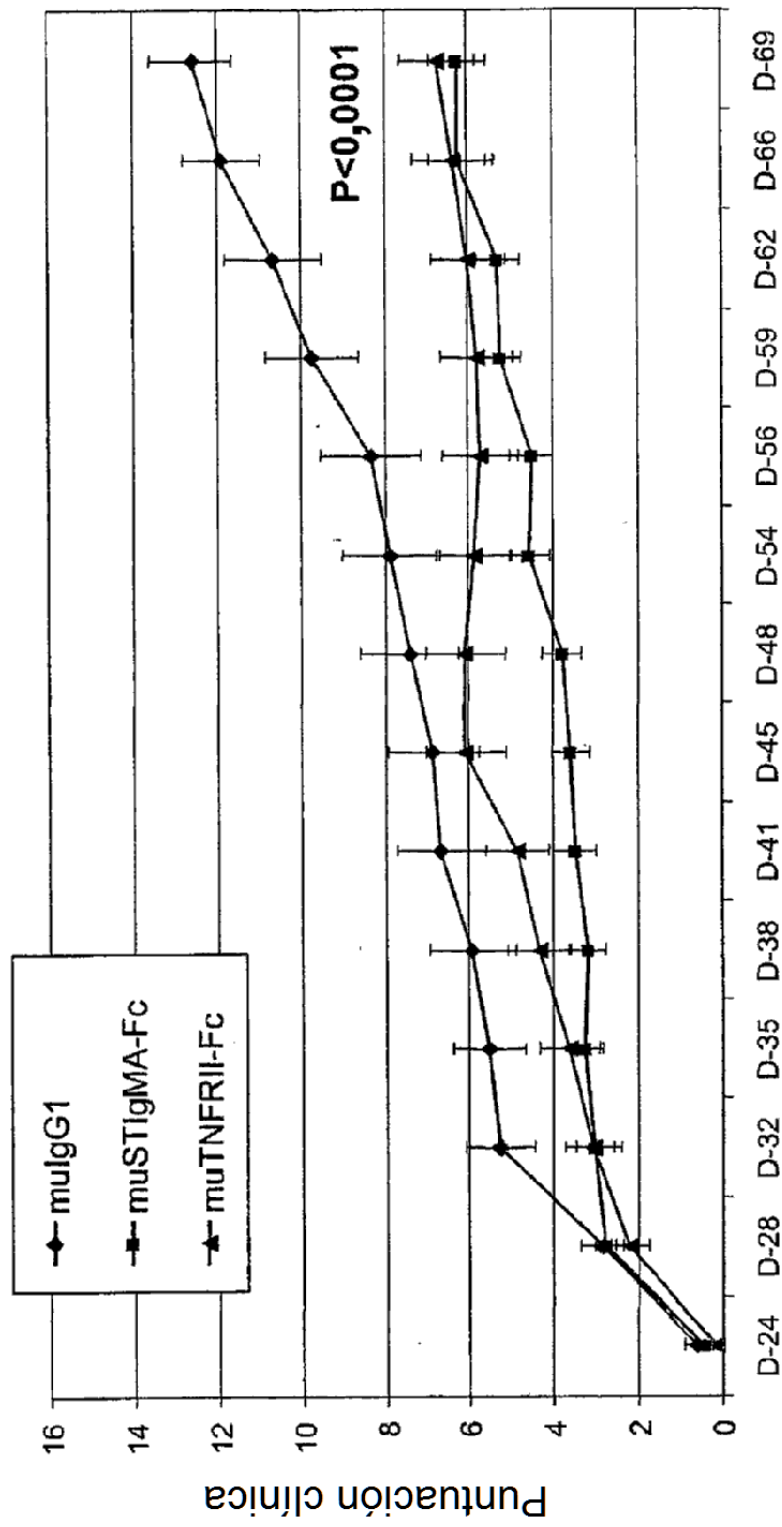


Figura 3 l

consen02 (SEC ID N°: 9)
GCAGGCAAAG TACCAGGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAAG GTTCCAGGAG 50
ATGTATCCCT CCAATTGAGC ACCCTGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC 100
ACGTGTGAAG TCACCTGGCA GACTCCTGAT GGCAACCAAG TCGTGAGAGA 150
TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAACT CTCTGACTCC AAGCCCACAG 200
TGACAACTGG CAGCGGTTAT GGCTTCACGG TGCCCCAGGG AATGAGGATT 250
AGCCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTTCTCC TCCGATCAGT TATATTTGGT 300
ATAAGCAACA GACTAATAAC GAGGGAACCC ATCAAAGTAG CAACCCTAAG 350
TACCTTACTC TTCAAGCCTG CGGTGATAGC CGACTCAGGC TCCTATTTCT 400
GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGCTCTGAGC AGCACAGCGA CATTGTGAAG 450
TTTGTGGTCA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACCAAGA CTGAGGCACC 500
TACAACCATG ACATACCCCT TGAAAGAAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCCT 550
GGGACTGGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTGCTGGG 600
CCAGGAAAGA GCCTGCCTGT CTTTGCCATC ATCCTCATCA TCTCCTTGTG 650
CTGTATGGTG GTTTTTACCC TGGCCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT 700
CCCAACAAGA GCATGTCTAC GAAGCAGCCA GGGCACATGC CAGAGAGGCC 750
AACGACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC 800
CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCAACAATA CTCTGATGAG 850
CCCTGCATAG GACAGGAGTA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCAACTA 900
CGCCCGCCTG CTGGACACAG TTCCTCTGGA TTATGAGTTT CTGGCCACTG 950
AGGGCAAAAG TGTCTGTAA AAATGCCCA GAGCCACAAG ATCTGCTGAC 1000
ATAATTGCCT AGTCAGTCCT TGCCTTCTGC ATGTCCTTCT TCCCTACTAC 1050
CTCTCTTCCT GGATAGCCCA AAGTGTCCGC CTACCAACAC TGGAGCCGCT 1100
GGGAGTCACT GGCTTTGCCC TGGAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAAGC 1150
GAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGGCTT 1200
CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCATA GCACTAGGAC 1250
TTGGTCATCA TGCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG 1300
AAGACCCGAG GGGATTCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC 1350
TATTTACAG TCTCTTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT 1400
TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTTCTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT 1450
TCTGACTCTC TCCTGGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA 1500
AAA 1503

Figura 32

Reducción de la hinchazón articular en los ratones tratados con STIgMA-Fc



Días después de la inmunización

Artritis inducida por colágeno

Figura 33

muSTIgMA-Fc inhibe la inflamación articular

mulgG1



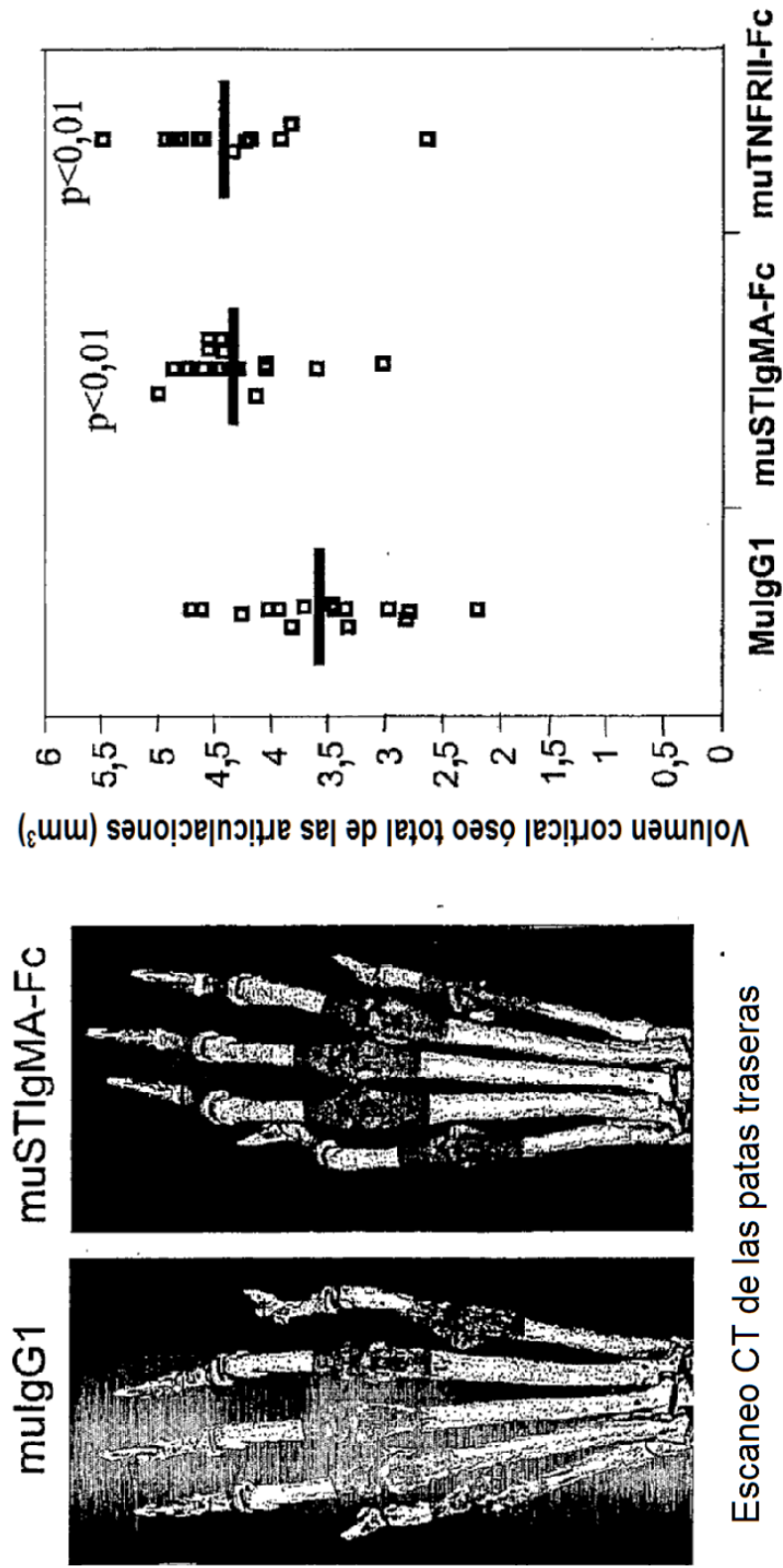
muSTIgMA-Fc



Tinción con H&E del tejido incluido en parafina
Artritis inducida por colágeno día 70

Figura 34

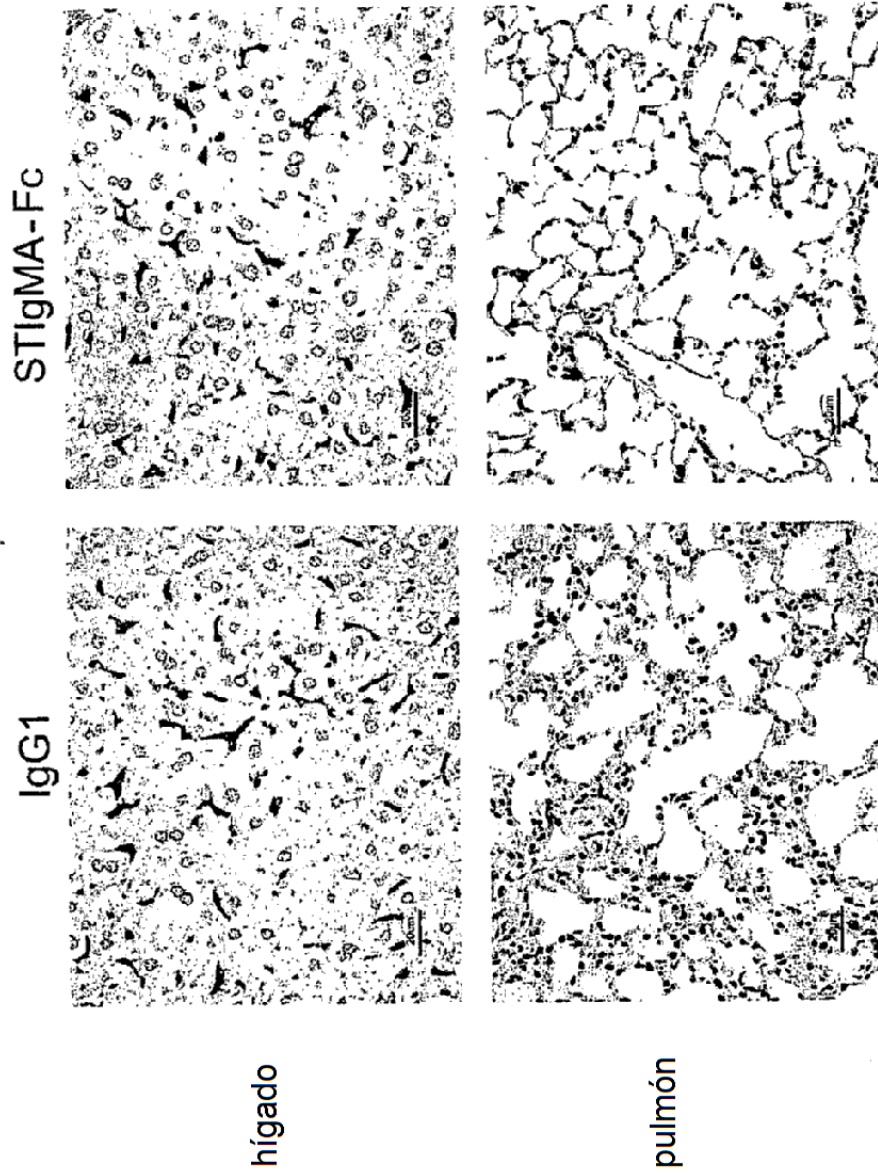
Conservación del volumen cortical óseo en las articulaciones de ratones tratados con muSTIgMA-Fc



Artritis inducida por colágeno día 70

Figura 35

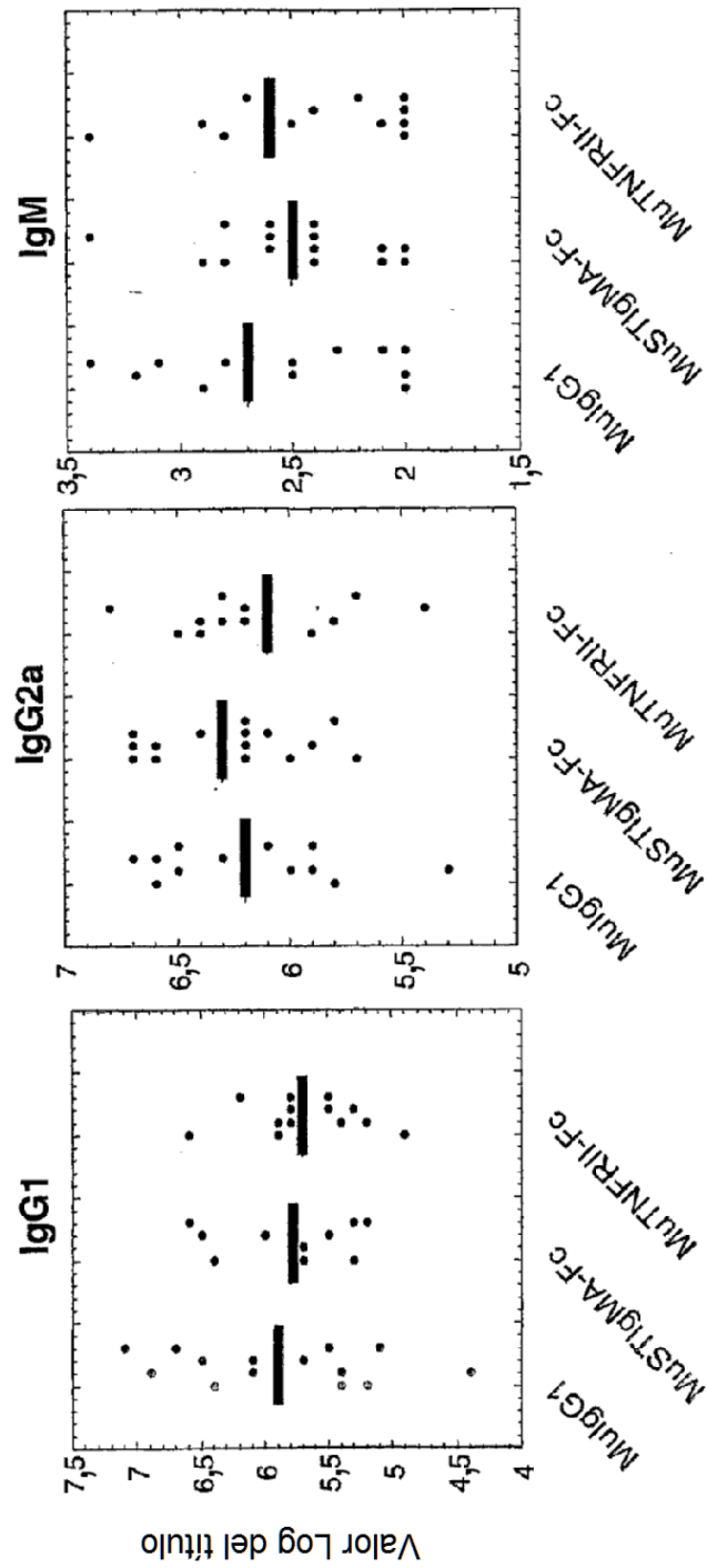
El tratamiento con STIgMA-Fc no altera el número ni la morfología de los macrófagos residentes en los tejidos



Artritis inducida por colágeno día 70

Figura 36

El tratamiento de muSTIgMA-Fc no afecta a los títulos de anticuerpos anti-colágeno en suero



El ensayo Anova no muestra diferencias entre grupos
Artritis inducida por colágeno día 70

Figura 37

muSTIgMA-Fc no altera la respuestas de células B independientes de las células T *in vivo*

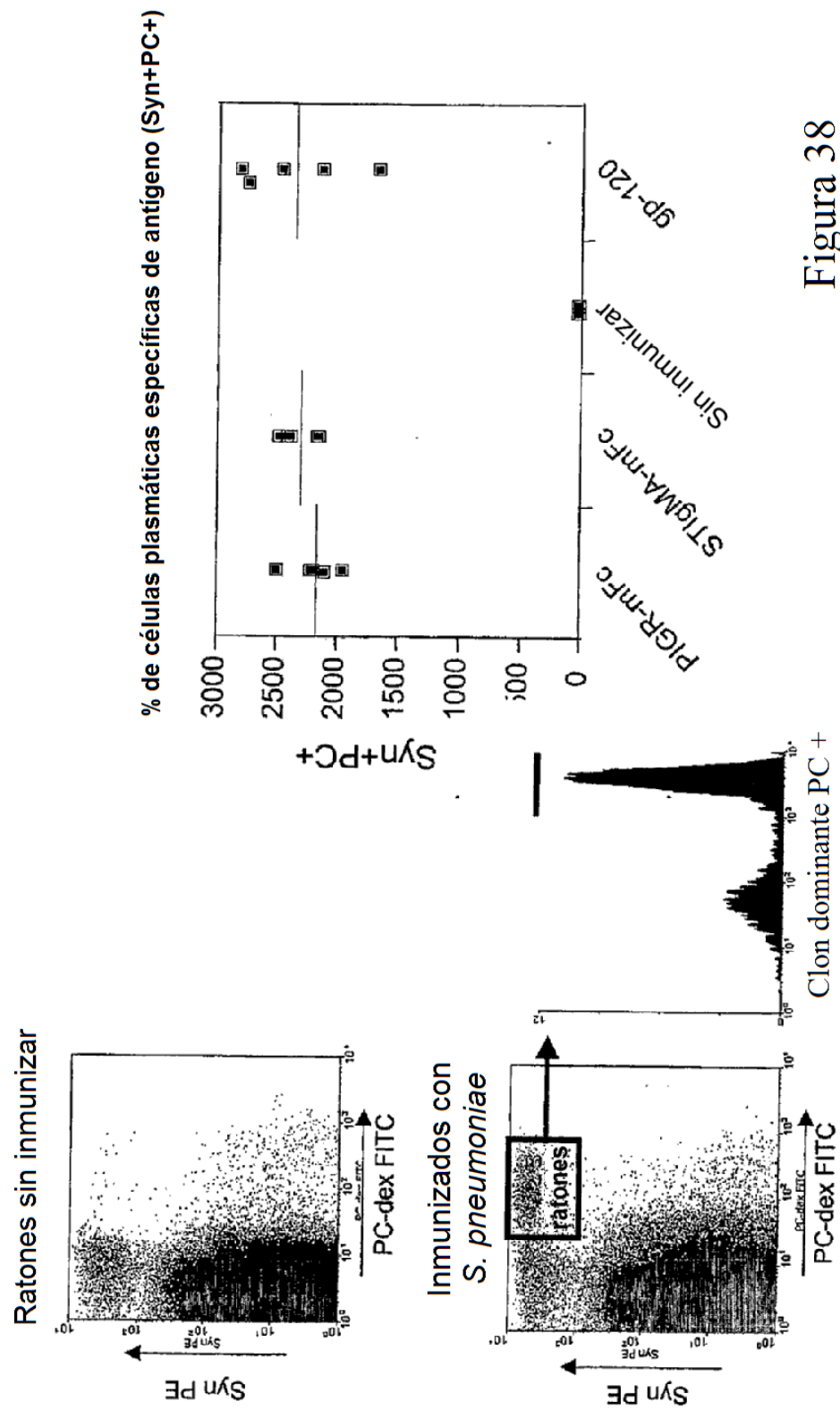
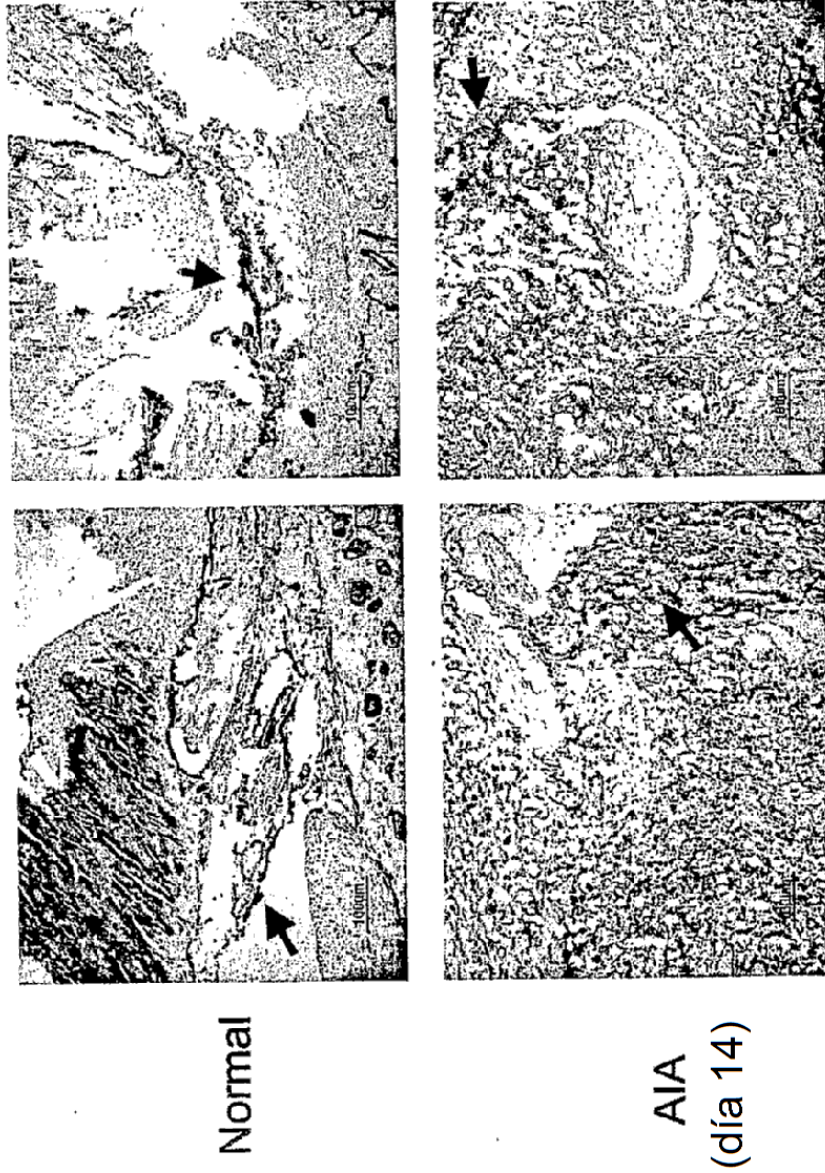


Figura 38

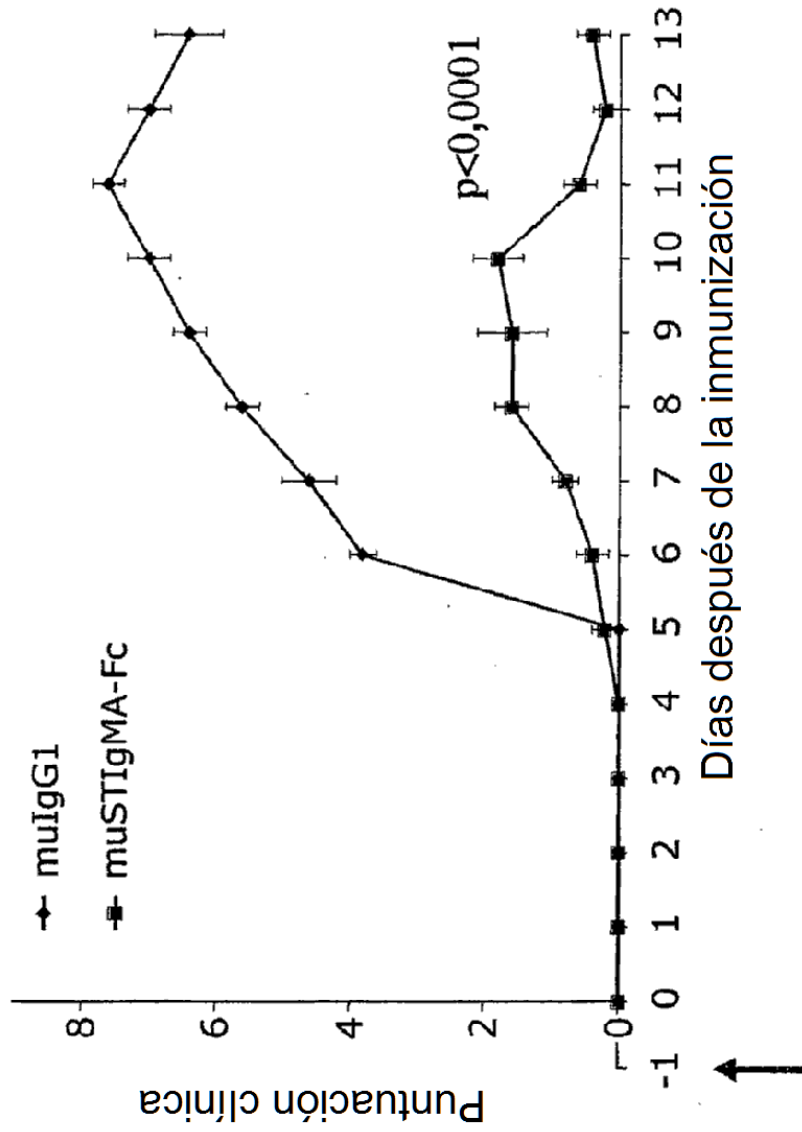
Infiltración de macrófagos en articulaciones después de artritis inducida por anticuerpos (AIA)



Tinción con F4/80 en articulaciones no descalcificadas congeladas

Figura 39

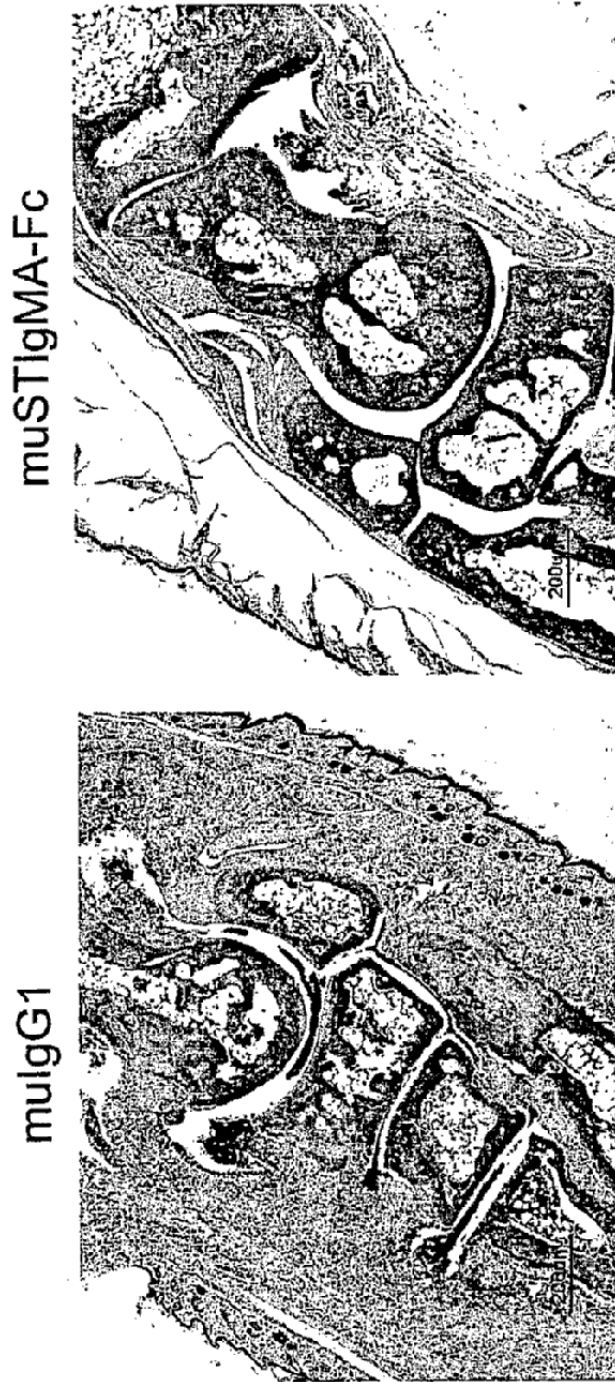
MuSTIgMA-Fc previene la hinchazón articular después de artritis inducida por anticuerpos en ratones balb/c



comienzo del tratamiento con mSTIgMA-Fc

Figura 40

MuSTIgMA-Fc inhibe la inflamación articular en la artritis inducida por anticuerpos



- Los ratones tratados con el control (mulgG1) tienen artritis de moderada a grave (izquierda)
- Los ratones tratados con muSTIgMA-Fc tienen o no tienen artritis mínima (derecha)

Tinción con H&E

Figura 41

Generación de ratones mSTlgMA knock-out

Construcción de STlgMA Knock-out

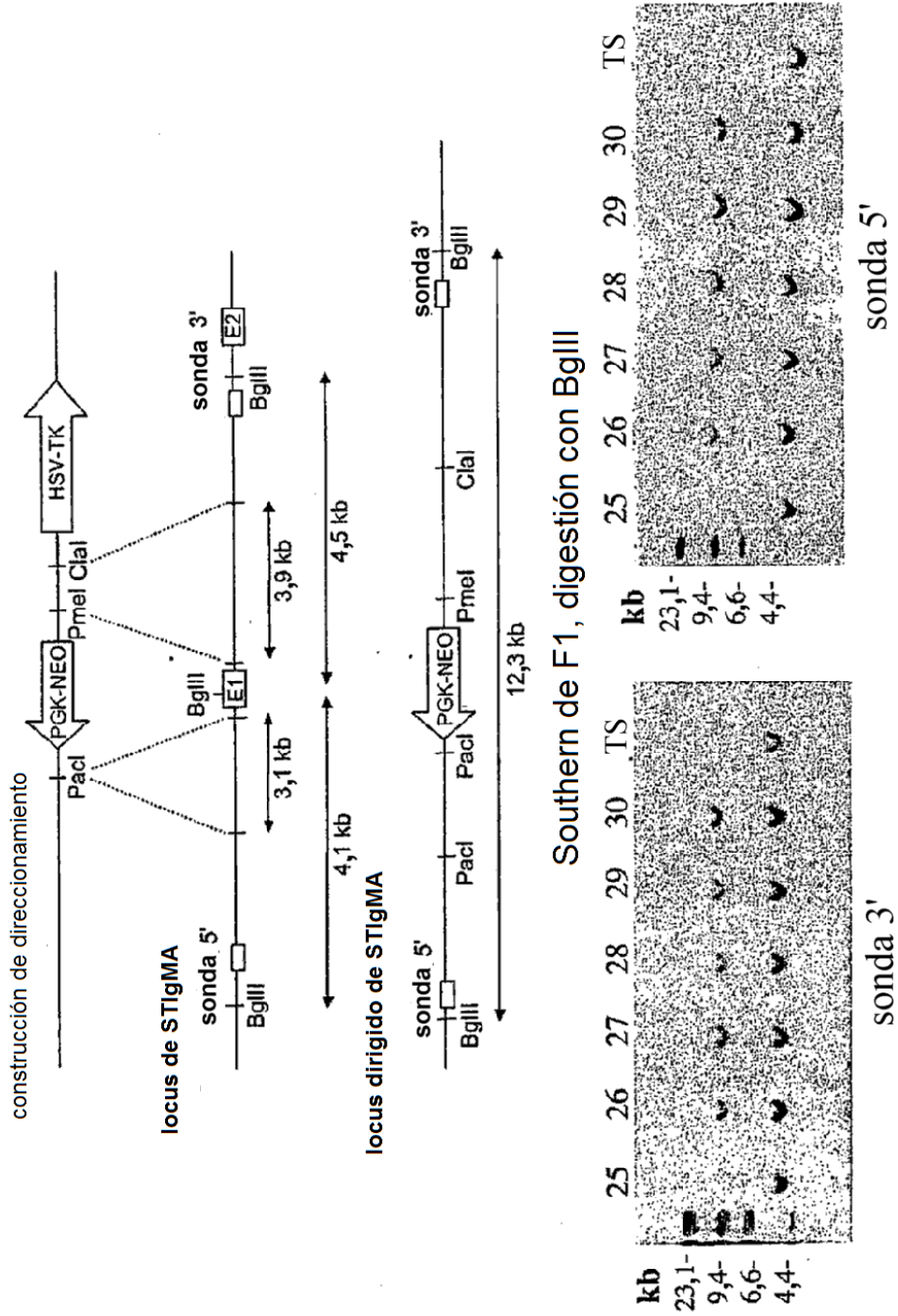


Figura 42

El STIgMA murino-Fc se une a glóbulos rojos de oveja opsonizados con C3 (E-IgM)

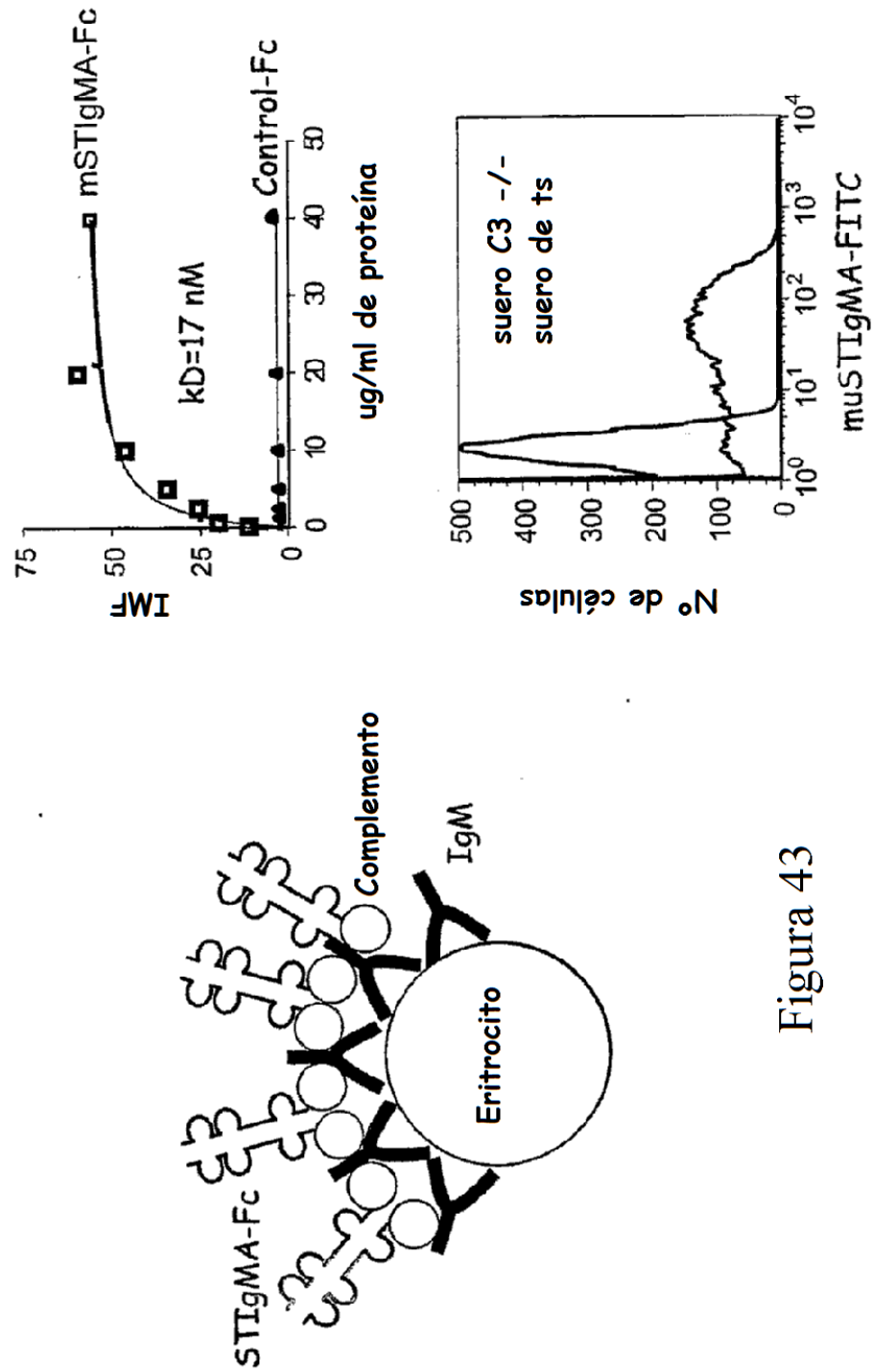
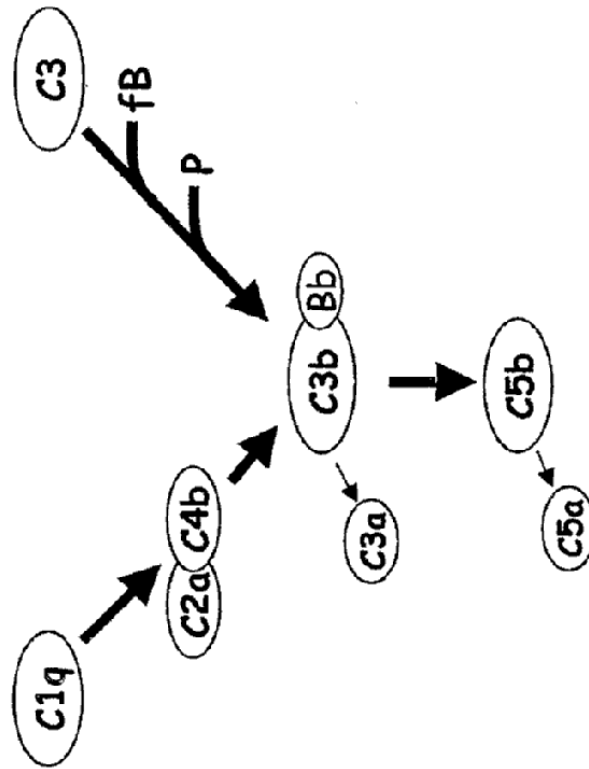
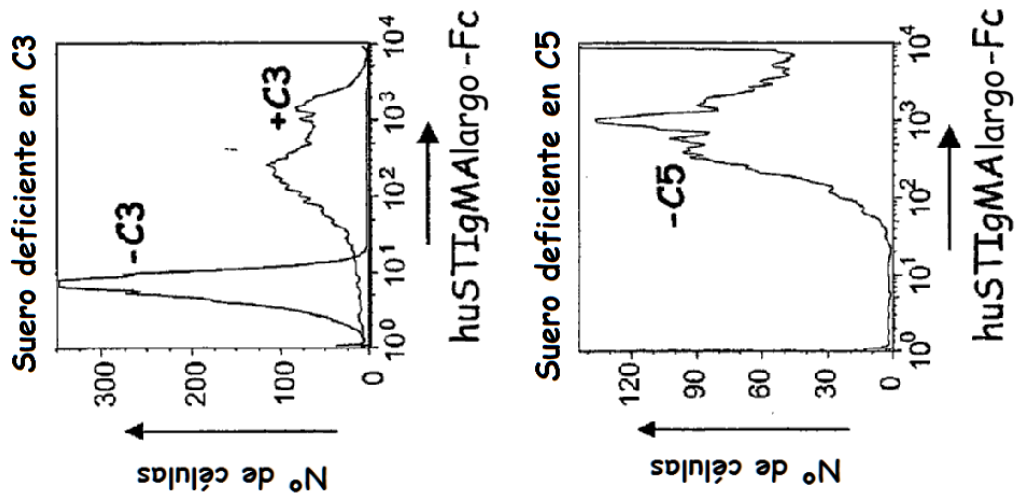


Figura 43

La unión de STIgMA humano-Fc a las E-IgM es dependiente de C3



Se descubrieron resultados similares con el STIgMA humano-DEC

Figura 44

Unión de partículas opsonizadas con suero a las células CHO que expresan STIgMA

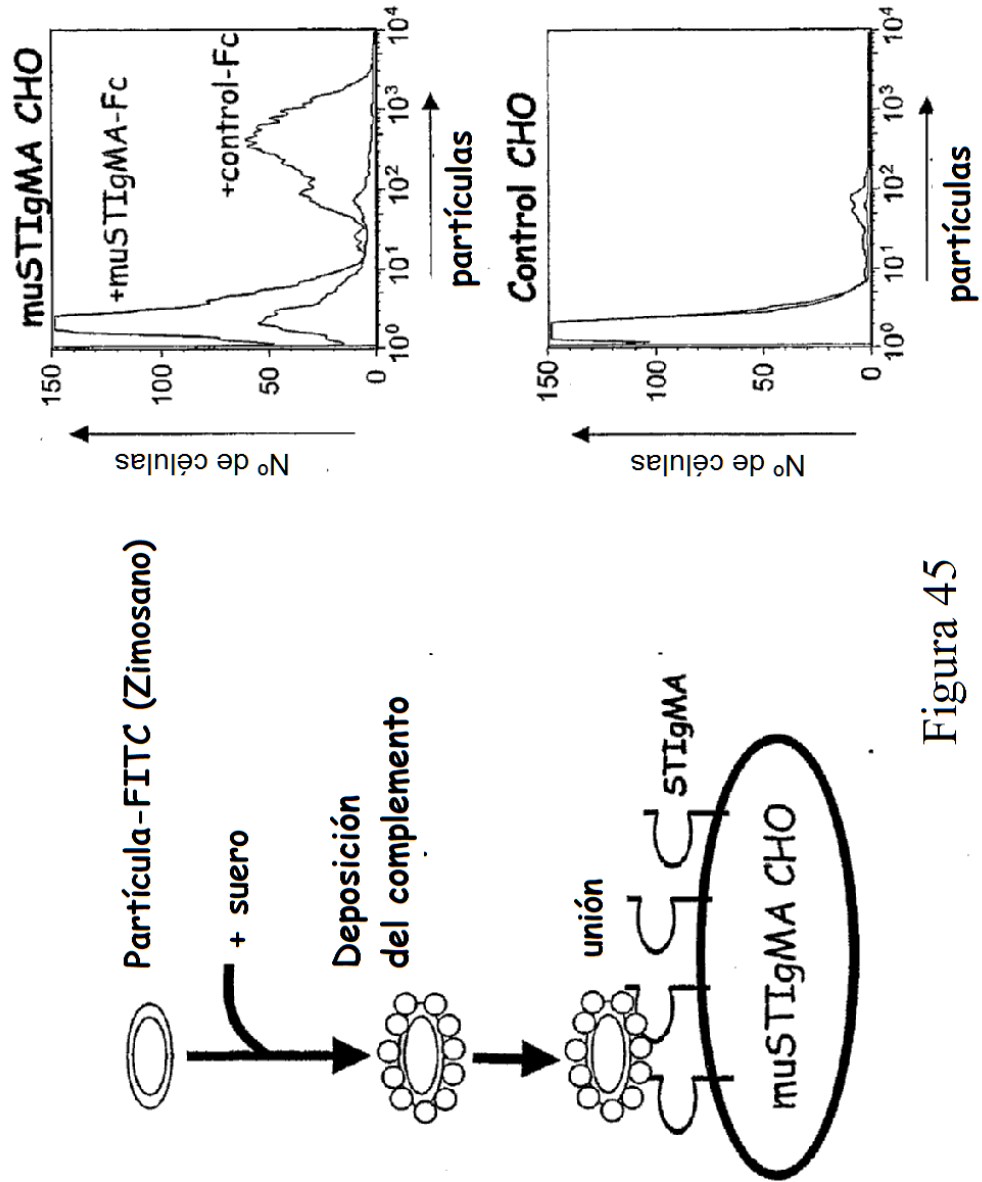
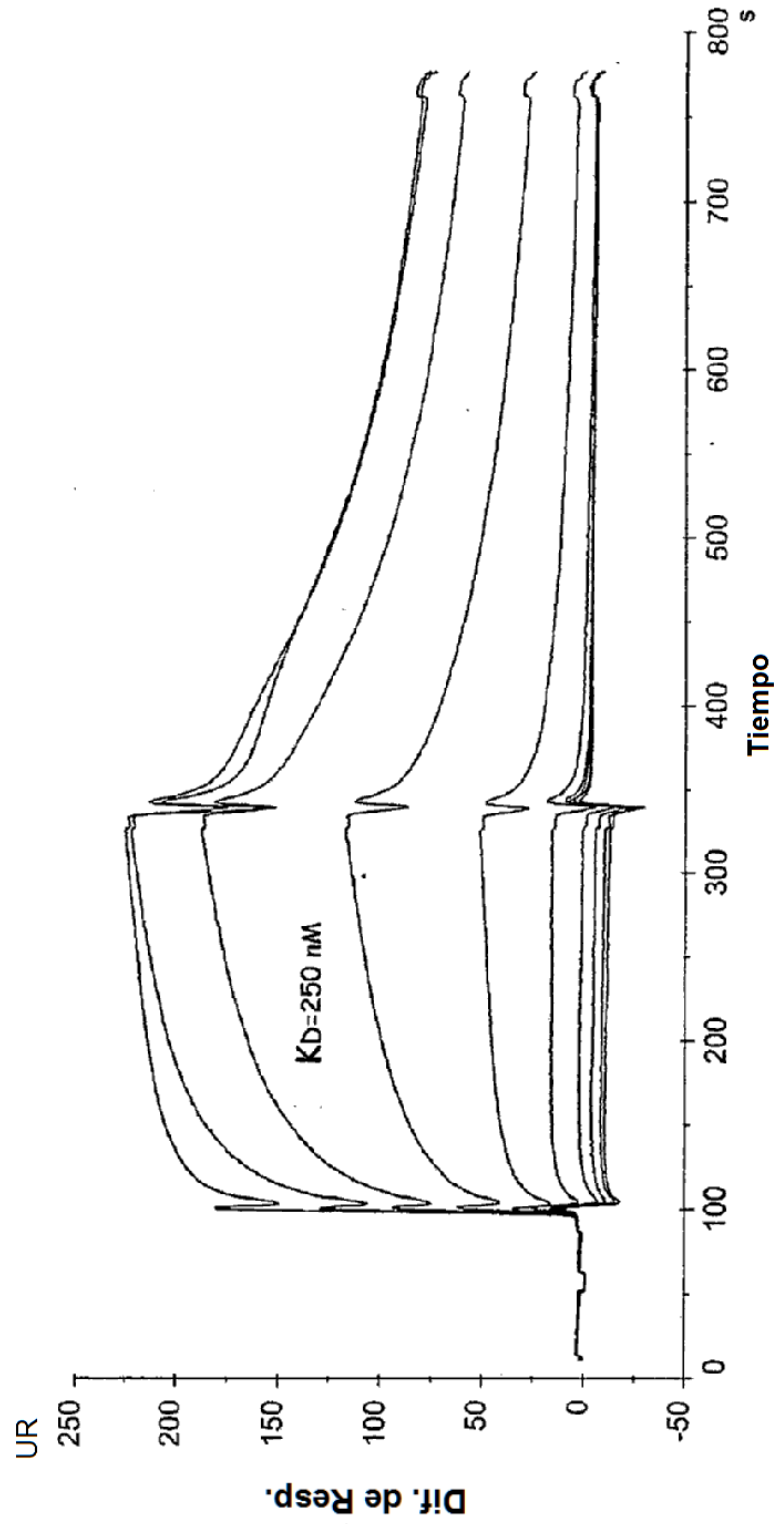


Figura 45

muSTIgMA Fc se une a C3b



- C3b, C3bi se unen
- C2, C4, C3d no se unen

Biacore: 1720 UR recubiertas de C3b; concentraciones crecientes de 4-2000 nM de mSTIgMA-mFc fluyeron a través de la célula

Figura 46

El STIgMA de ratón y humano-Fc se unen a C3b del complemento

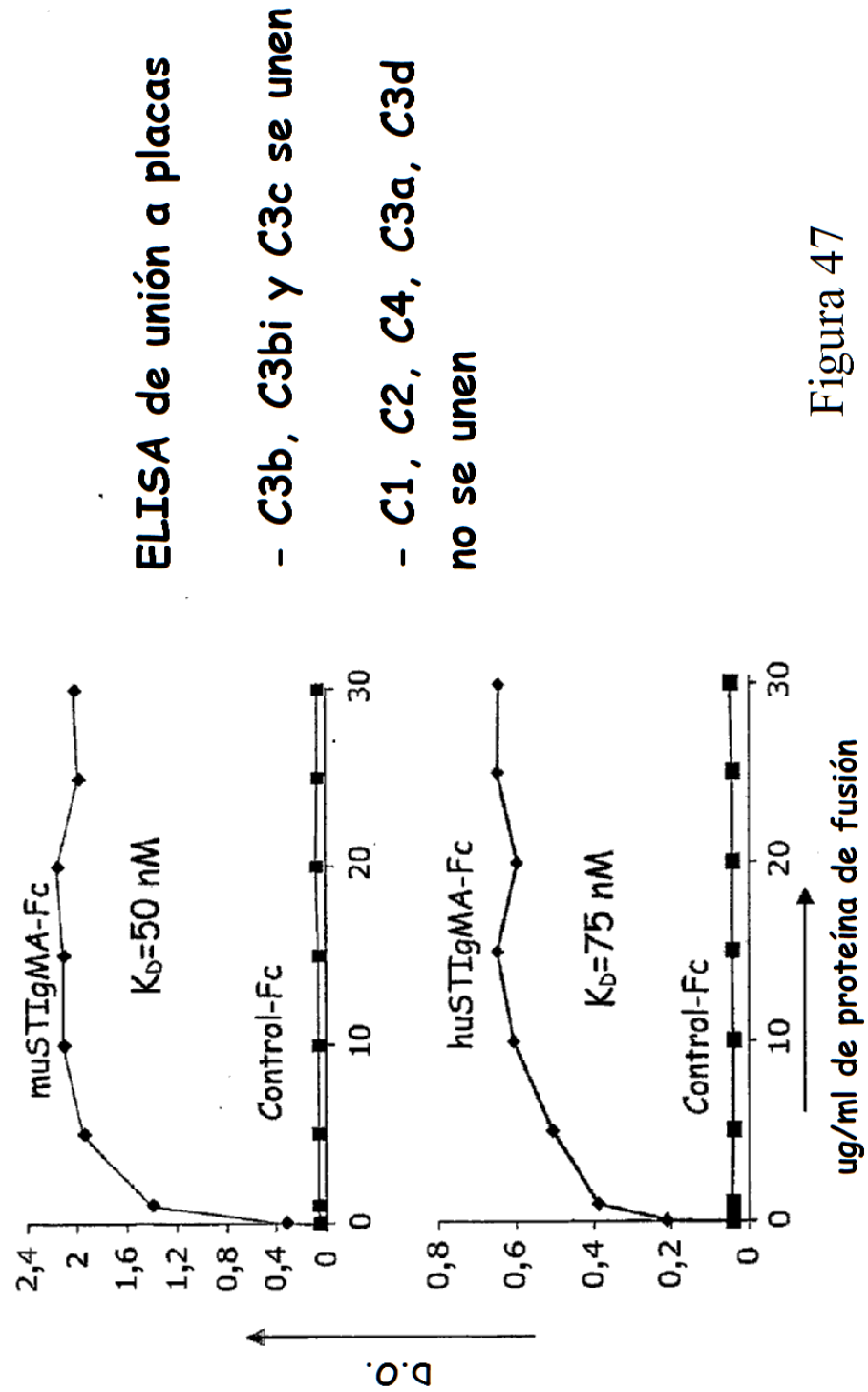
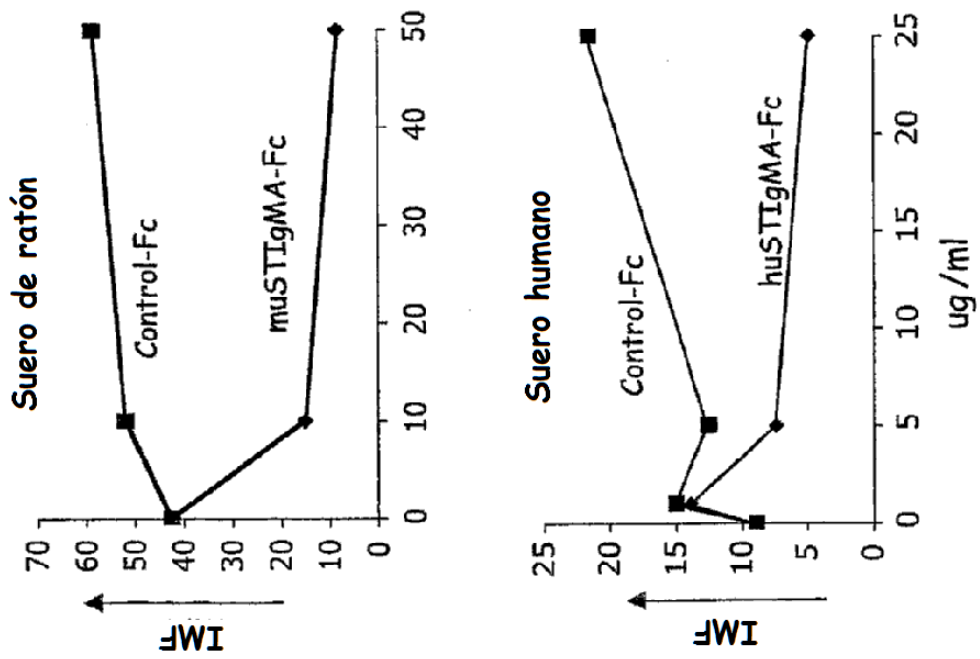


Figura 47

El STIgMAC de ratón y humano-Fc inhiben la deposición de C3 en zimosano



Inhibe la deposición de C3 en:

- *Staph. aureus*
- *Listeria m.*
- Complejos inmunitarios
- Colágeno
- Superficies cargadas (plástico de cultivos tisulares)
- Todos en presencia de EGTA
- (Deposición mediada por la ruta alternativa)

Figura 48A

muSTIgMA-Fc inhibe la activación de C3 en suero

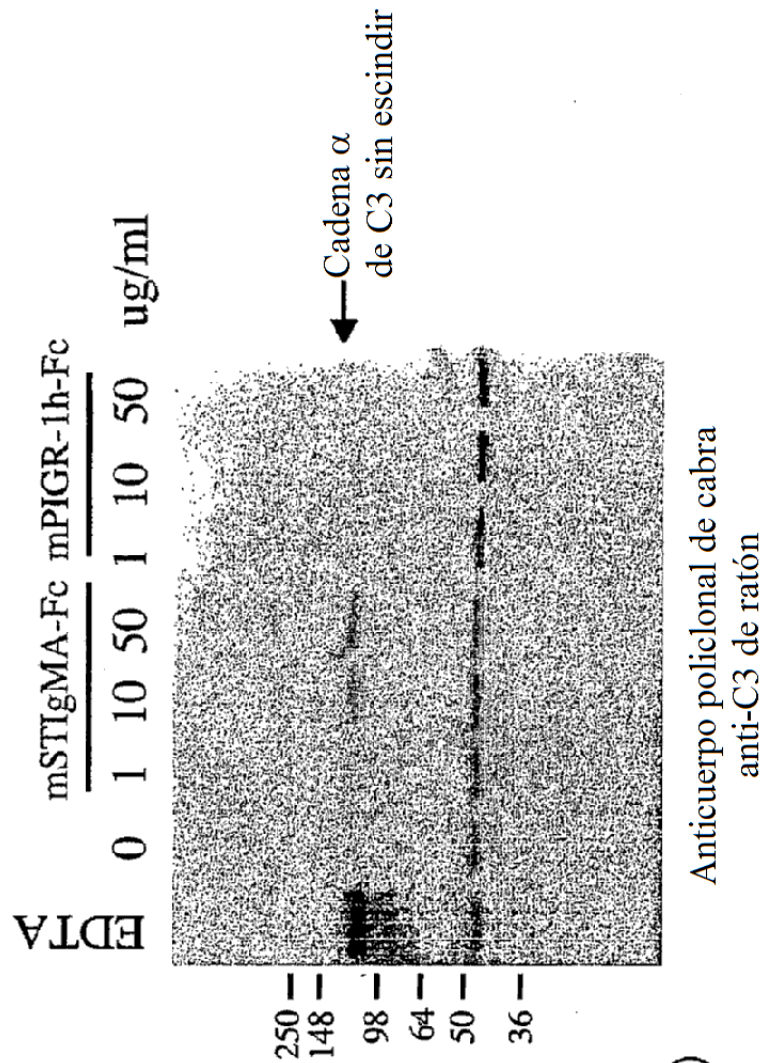
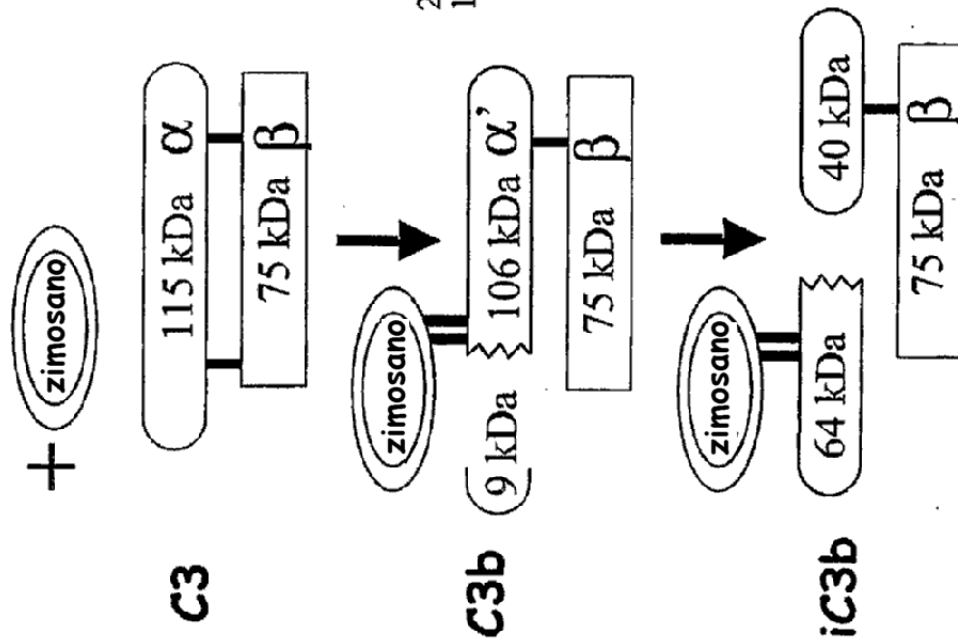


Figura 48B

STIgMA inhibe la hemólisis de GRO por la ruta alternativa

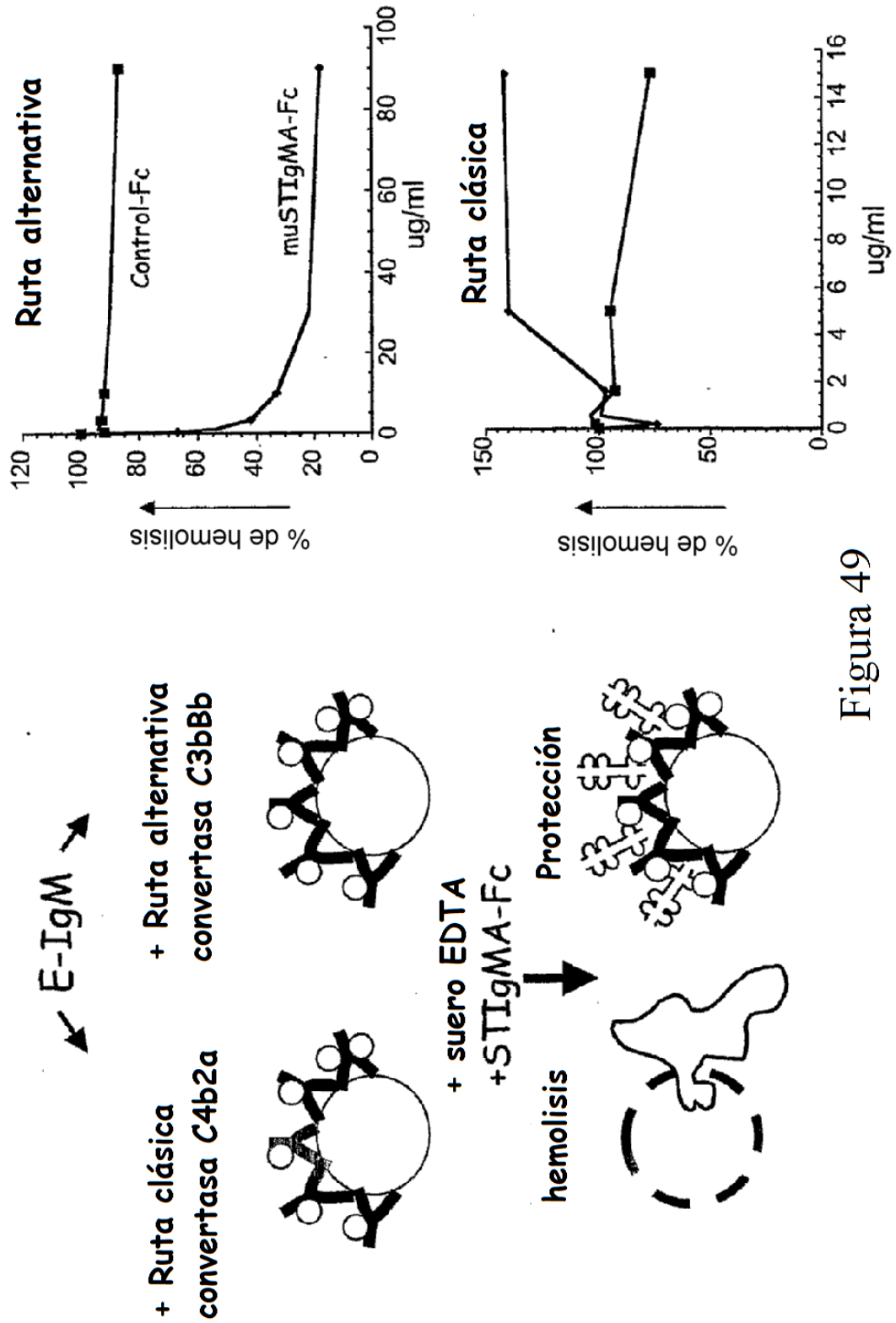


Figura 49

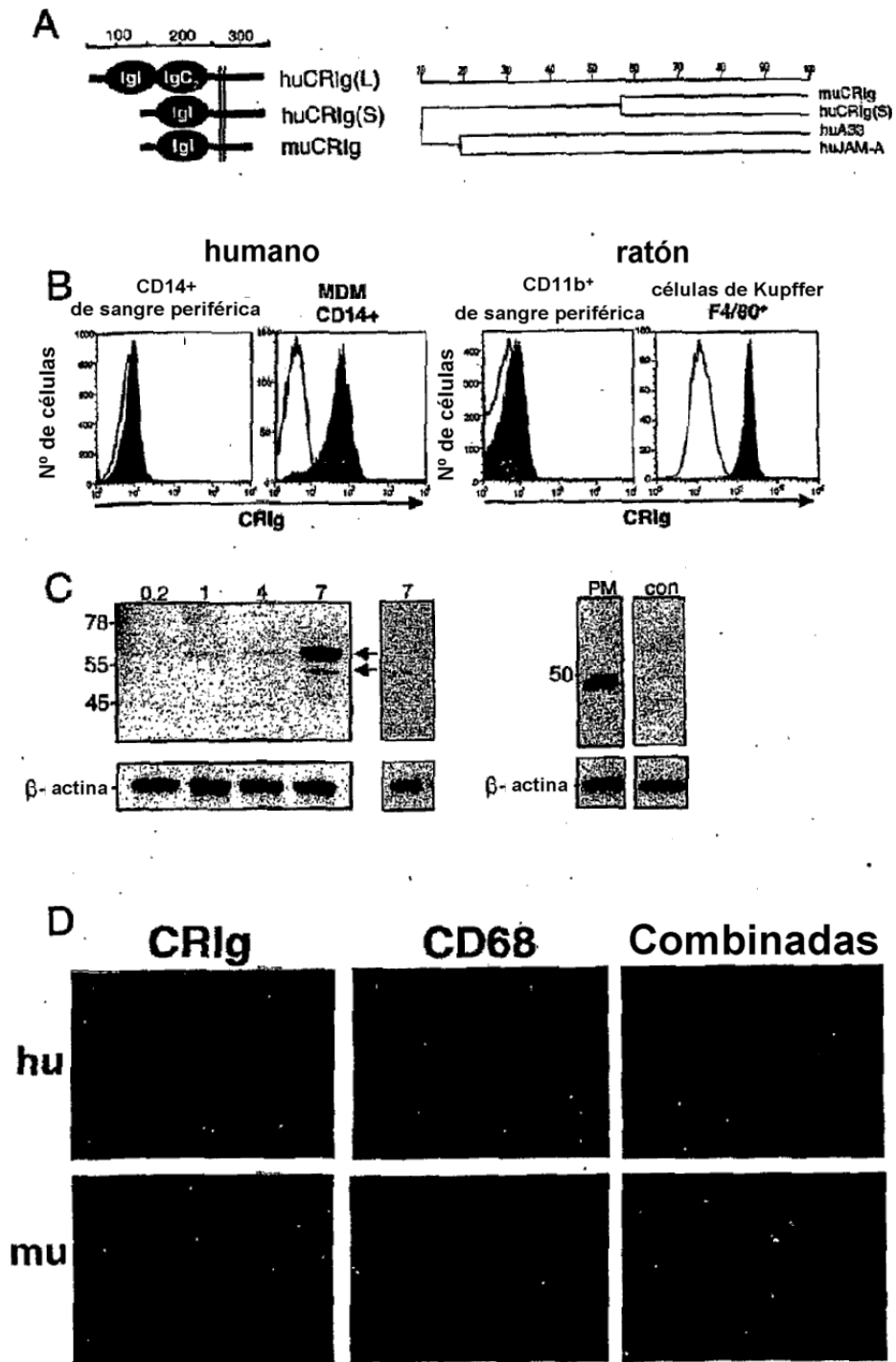


Figura 50

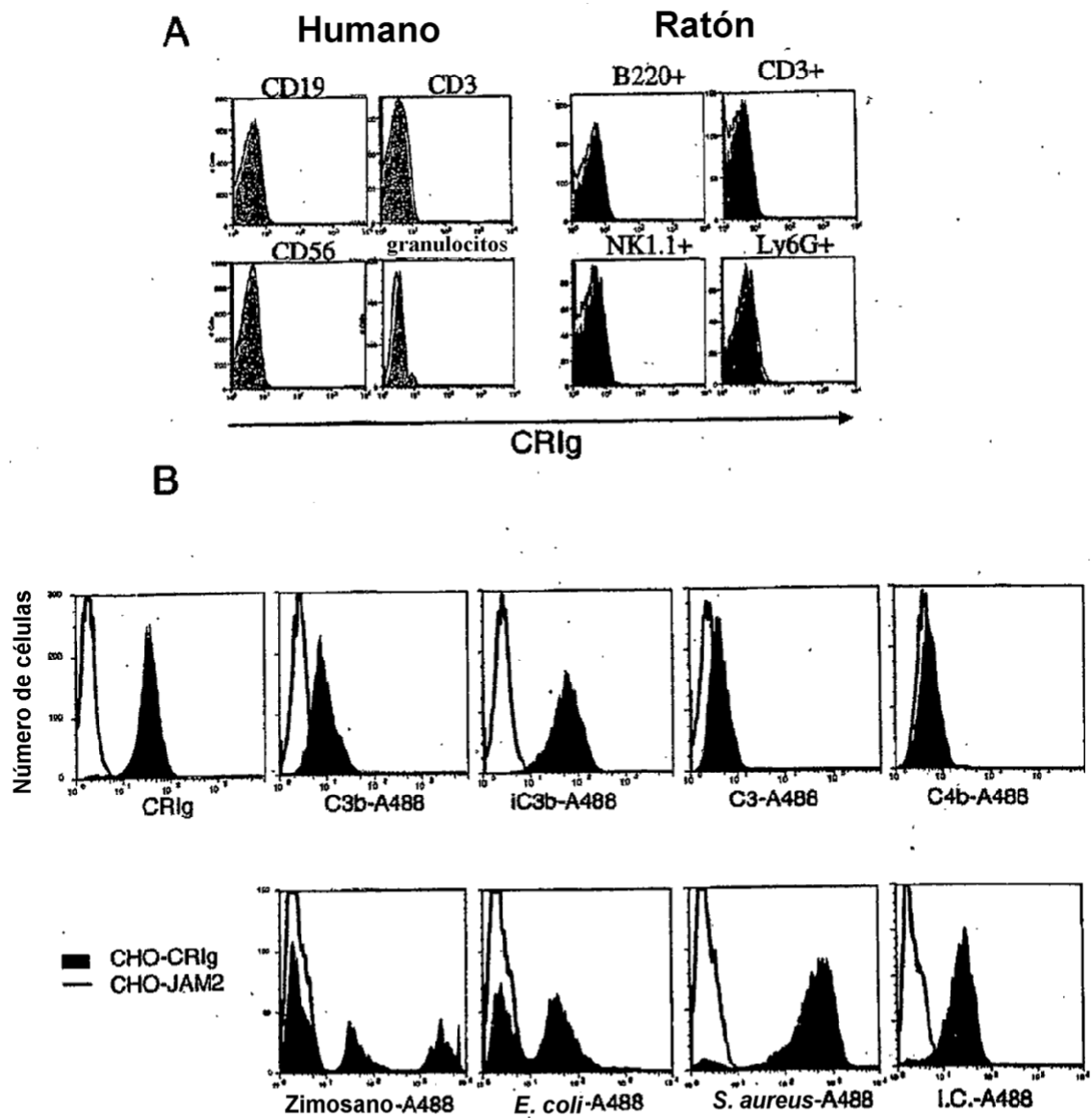


Figura 51

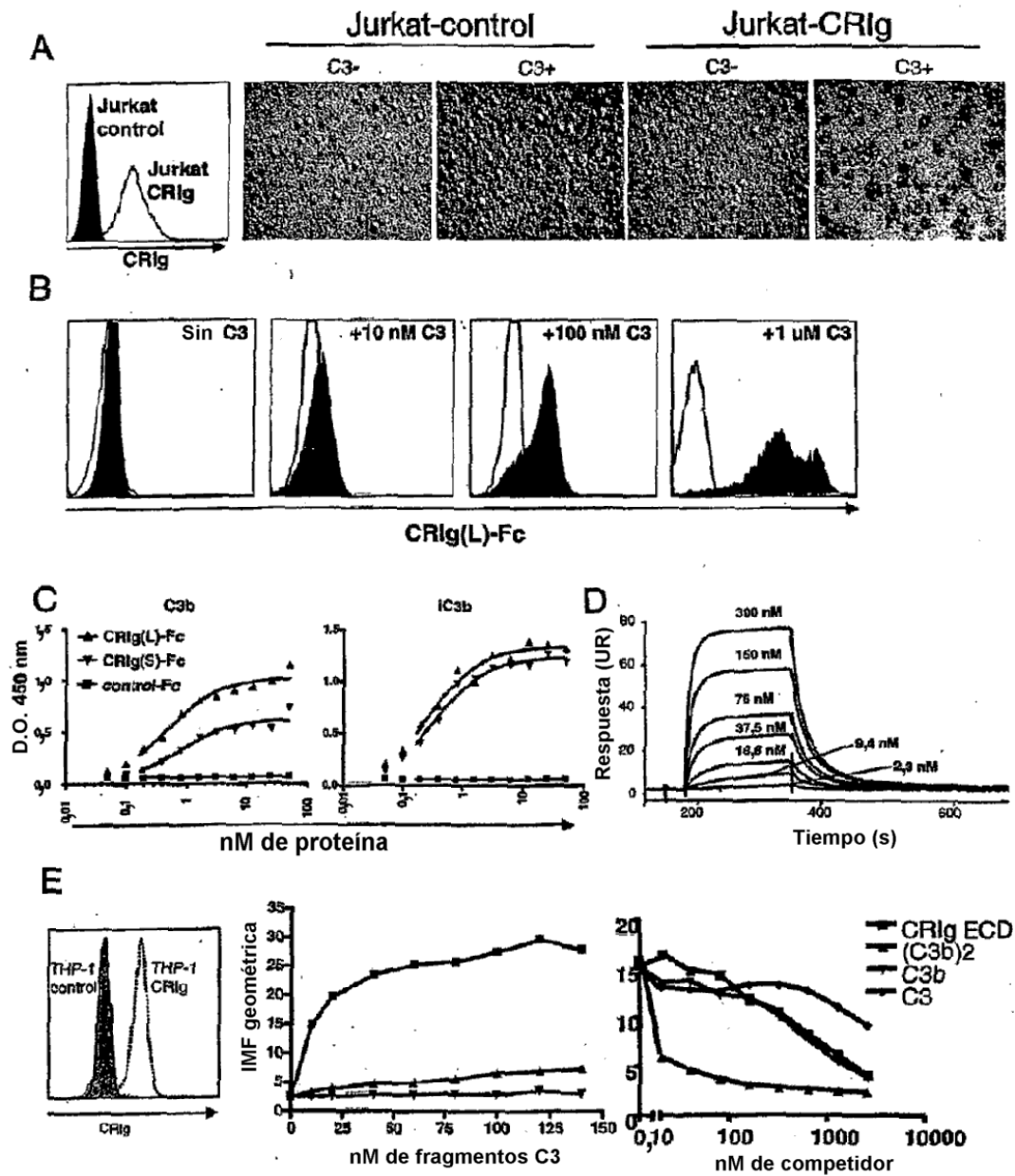


Figura 52

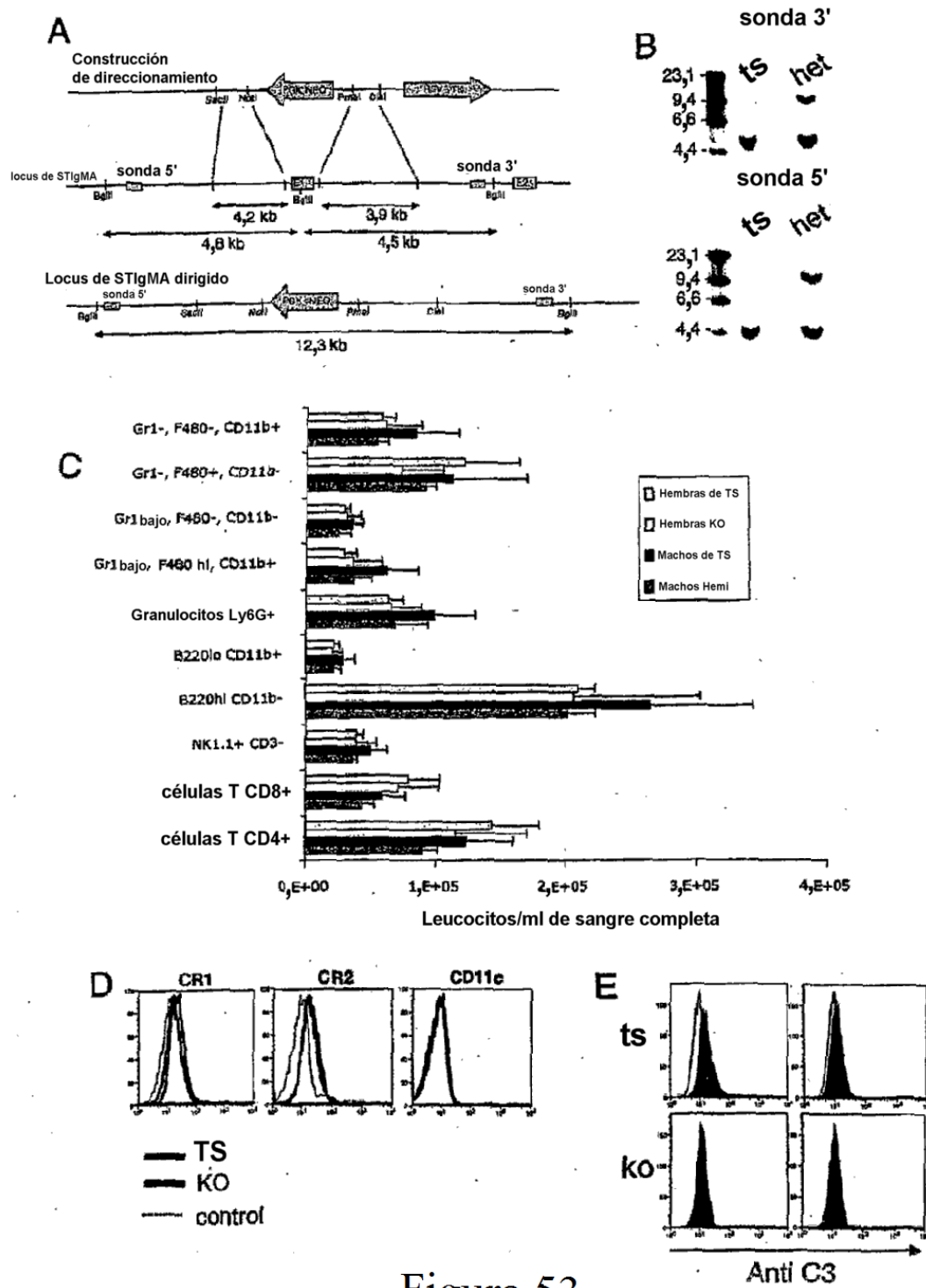


Figura 53

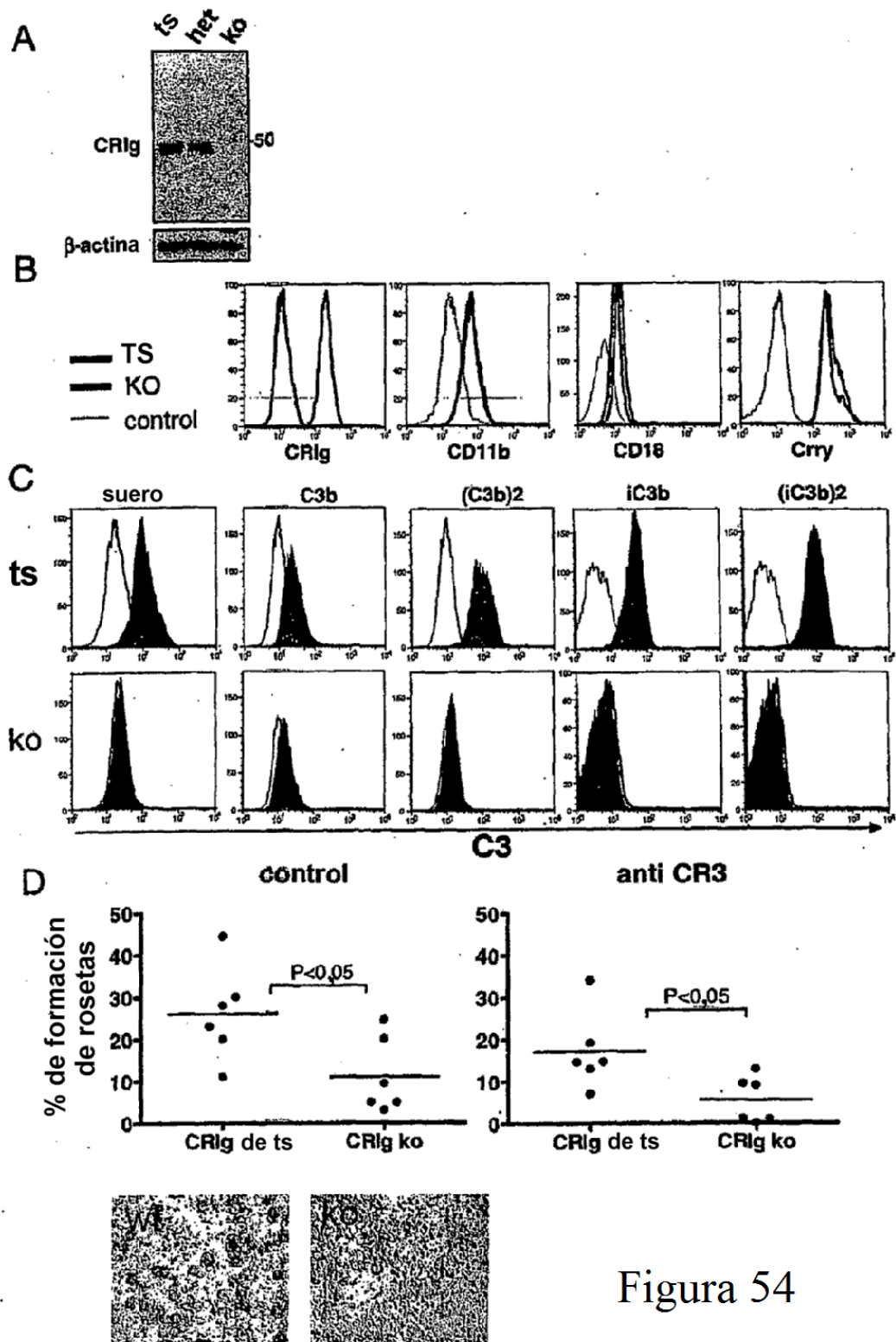


Figura 54

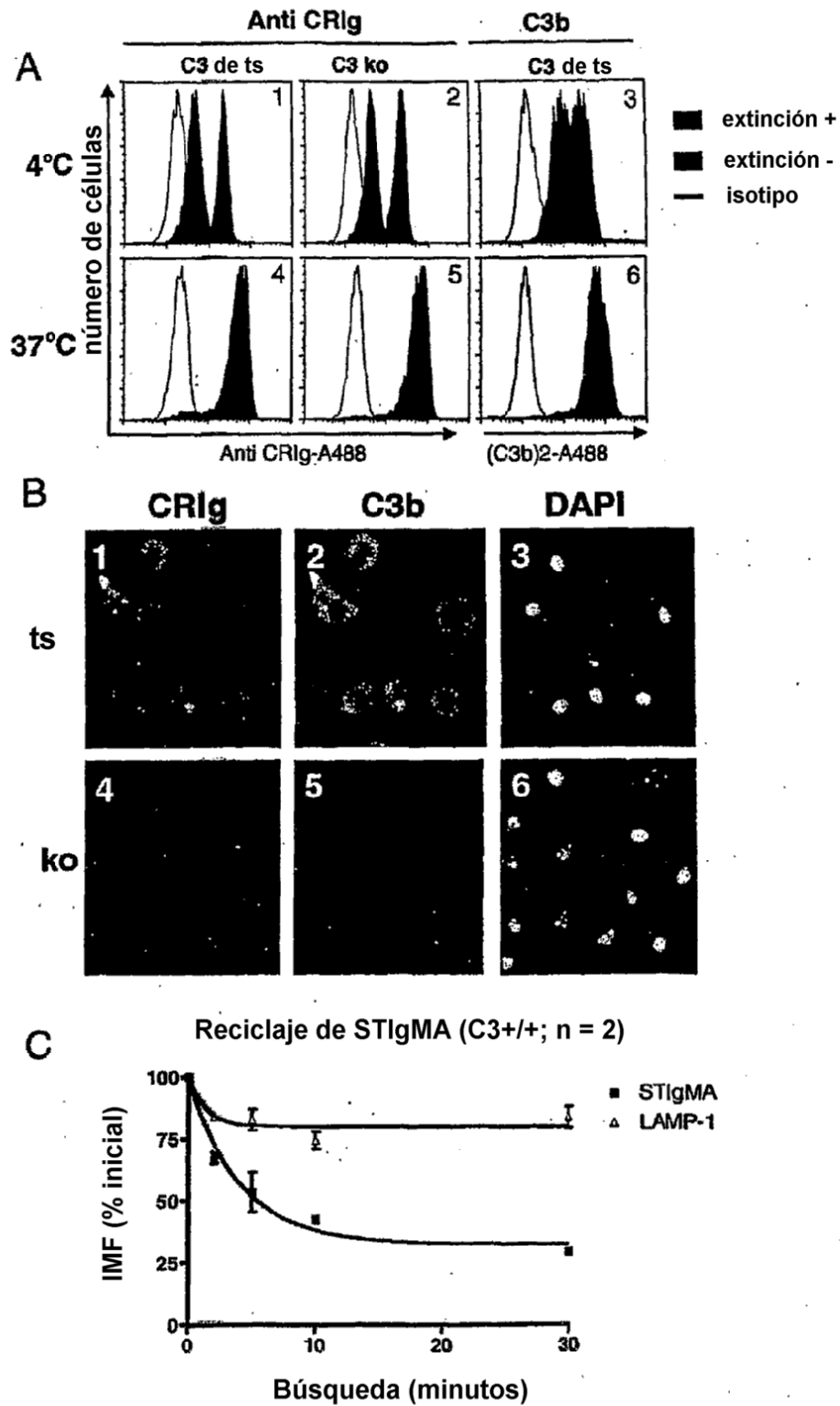


Figura 55

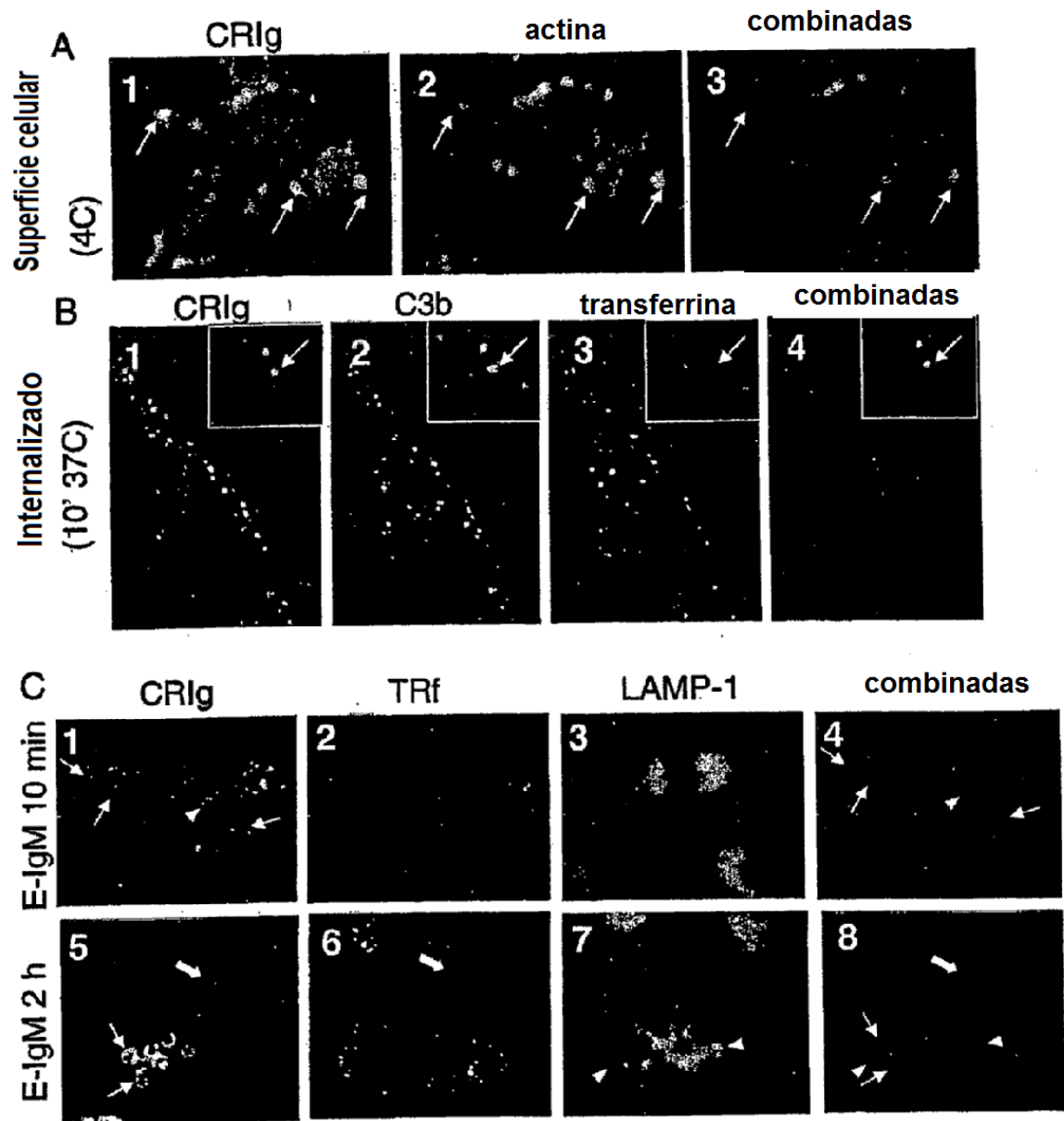


Figura 56

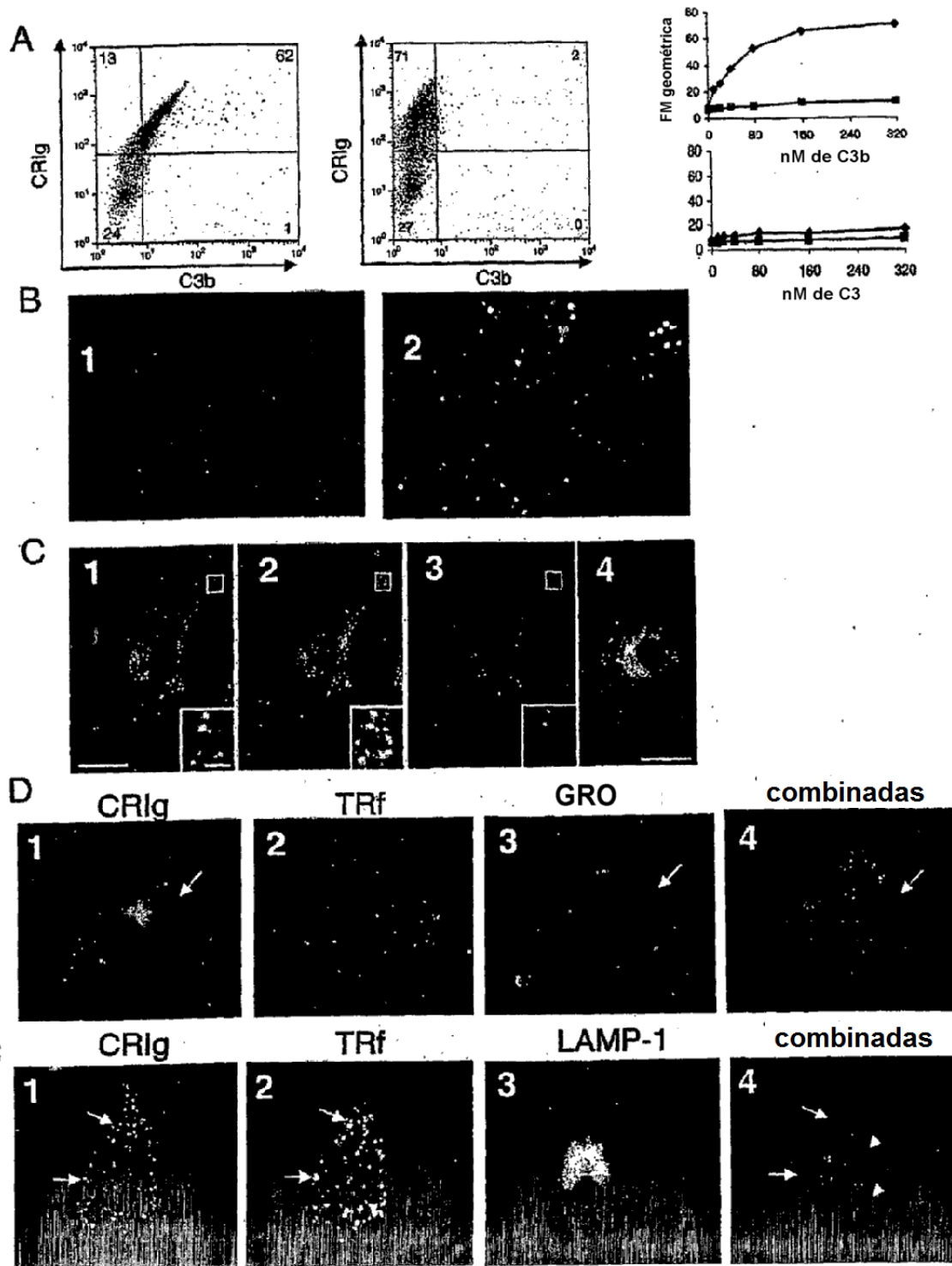


Figura 57

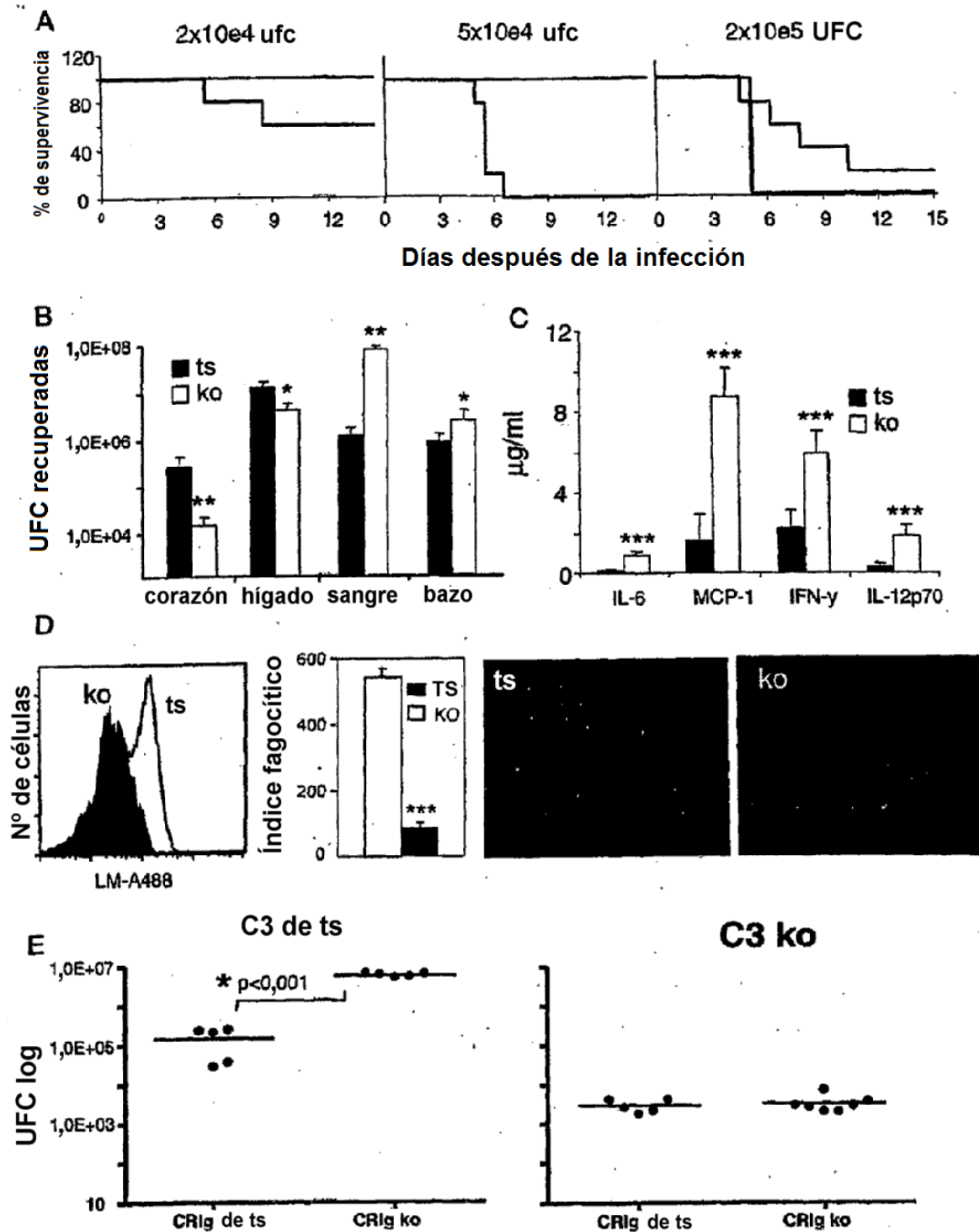


Figura 58

A

```

><enlazador de clonación>
CCTCGGTTCT
><Cla {subrayado=1-6, dir=f, Setiqueta=}>
ATCGATGCTCTCAATAAACACC
><MET>
><ADN185041_ClaI_F'etiqueta:ttttttttatcgattaaaccacc {subrayado=1-24, dir=f, Setiqueta=}>
<Comentario {trans=1-s, dir=f, res=1}>
ATGGGATCTTACTGGGCTGCTACTCTCTGGGCACCTTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATCCTGGAAGTGCCAGA
GAGTGTAAACAGGACCTTGGAAAGGGATGTGAATCTCCCTGACCTATGACCCCTTGAAGGCTTACACCCAAGTCTTGG
TGAAGTGGCTGGTACAACTGGCTCAGACCTGTACACCTTCTTCTACGTGACTCTTCTGGAGACCCATATCCAGCAGGCA
AAGTACCAGGGCCGCTCATGTGAGCCACAAAGTTCAGGAGATGTATCCCTCCAATTGAGCACCCCTGGAGATGGATGA
CCGAGGCCACTACACGTTGTGAAGTCACTGGCAGACTCCTGTATGGCAACCAAGTTCGTGAGAGATAAGATTACTGAGCTCC
GTGTCCAGAAACACTCCTCAAGCTACTCAAGACCAAGACTGAGGCCACCTACAACCATGACATACCCCTTGAAGGCAACA
TCTACAGTGAAGCAGTCTCTGGACTGGACCACTGACATG
><comienzo de hlg1 - región enlazadora (DKHTT) {subrayado=1-15, dir=f, Setiqueta=}>
GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGC
><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, Setiqueta=}>
ATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGGTCTCTCACCGTCTCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGBCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCTCTGCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCCAGGTGAGCC
TGACCTGCCGTGGTCAAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCCGGAGAACACTAC
AAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTTGACAAACCACTACACGCGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAA
><extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, Setiqueta=}>
TGAGTGGCAGCGCCCTAGA
><Sal {subrayado=1-6, dir=f, Setiqueta=}>
GTGACCTGCAGAAAGCT
><Xba>
TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

```

Figura 59
SEC ID: 20

```

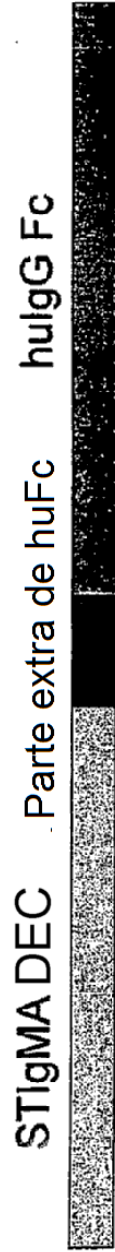
><Cla {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>ATCGATTAAACCACC
><Met {trans=1-s, dir=f, res=1}>
ATGGGATCTTACTGGGCTGCTACTCTGGGACCTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATCTCTGGAAGTCCAGA
GAGTGTACAGGACCTTGGAAAGGGATGTGATCTTCCCTGCACCTATGACCCCTGCAAGGCTACACCCAGTCTTTGG
TGAAGTGGCTGGTACAACTGGCTCAGACCTGTACCATCTTTCTAGTACTCTTCTGGAGACATATCCAGCAGGCA
AAGTACCAGGCCCTGCATGTGAGCCACAAAGTTCCAGGAGATGTATCCCTCCATTTGAGACCCCTGGAGATGGATGA
CCGAGGCCACTACAGTGTGAAGTCACTGGCAGACTCTCTGTATGGCAACCAAGTCGTGAGAGATAAGATTACTGAGCTCC
GTGCCAGAACTCTCTGTCTCCNAGCCACAGTGCACAACTGGCAGCGGTATGGCTACAGGTGCCCGGAGATGAGG
ATTAGCCTTCAATGCCAGGTCGGGTCTCTCTCCATCAGTATATTTGGTATAAGCAACAGACTAATAACCAAGAACCC
CATCAAAGTAGCAACCCTAAGTACTTACTCTTTCAGCCTGGGTGATAGCCGACTCAGGCTCCTATTCTTGCAGTSCCA
AGGCCAGGTTGGCTCTGAGCAGCACAGCGACATGTGAAGTTGTGTCAAAAGACTCCTCAAAGCTACTCAAGACCAAG
ACTGAGGCACCTACAAACATGACATACCCCTTGAAGCAACATCTACATGAAGCAGTCTCTGGGACT
><Cebador mutagénico {subrayado=1-52, dir=f, 5etiqueta=}>
GGACCACTGCATG
><Comienzo de hlg1 - región enlazadora (DKHT)>
GATAAACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCTTCCCCCAAACCC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGTCACTGCTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, 5etiqueta=}>
ATAATGCCAAGACAAGCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAAGCTCTGACCCAG
GACTGGCTGATGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCTGAGTCCCGGAGAGATGACCAAGAACCCAGGTACGCC
TGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCCTGGAGTGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAGAACACTAC
AAGACCCAGCCTCCCGTGGTGGACTCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAAGGTGGACAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGGAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAA
><extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, 5etiqueta=}>
TGAGTGGACGGCCCTAGA
><Sal {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
GTCGACCTGCAGAAGCT
><xba>
TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

```

Figura 60
SEC ID: 21

Distintas secuencias de aminoácidos unidas

Nueva construcción de Fc (en pRK5L)



Antigua construcción de Fc (en pRK5)

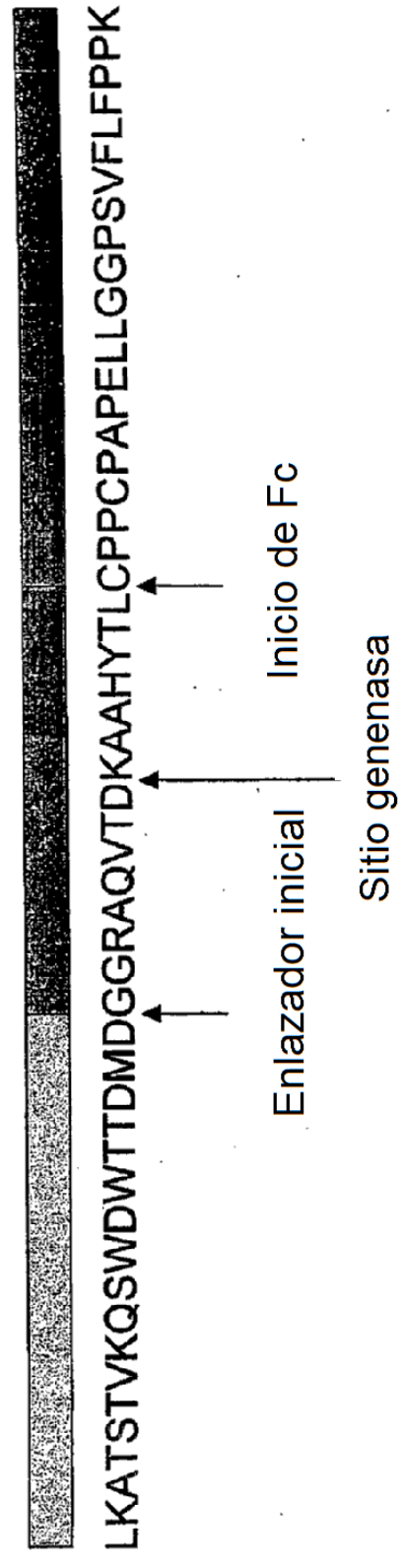


Figura 61

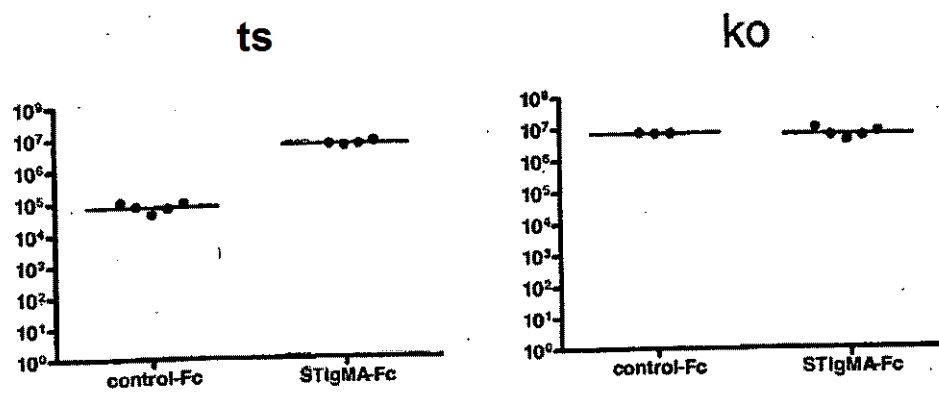


Figura 62

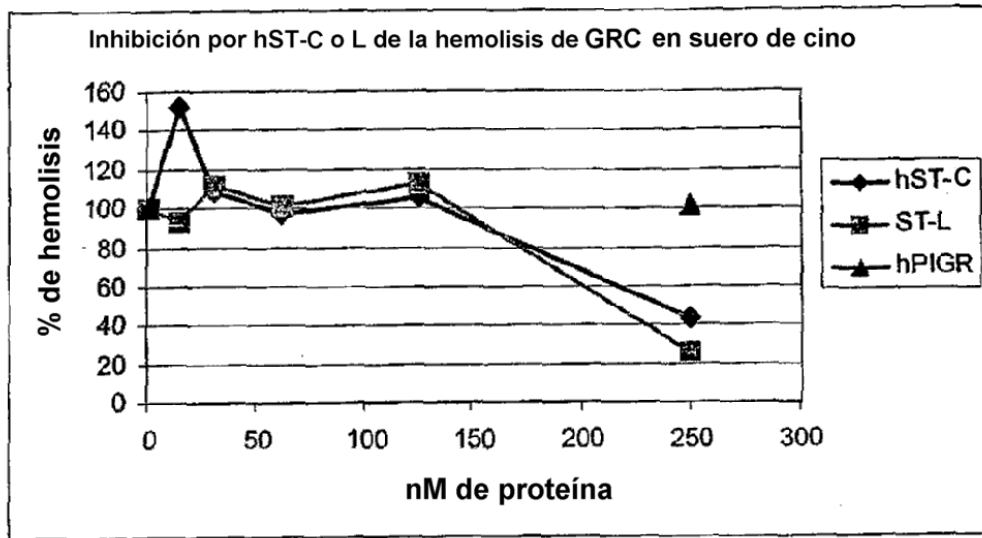


Figura 63A

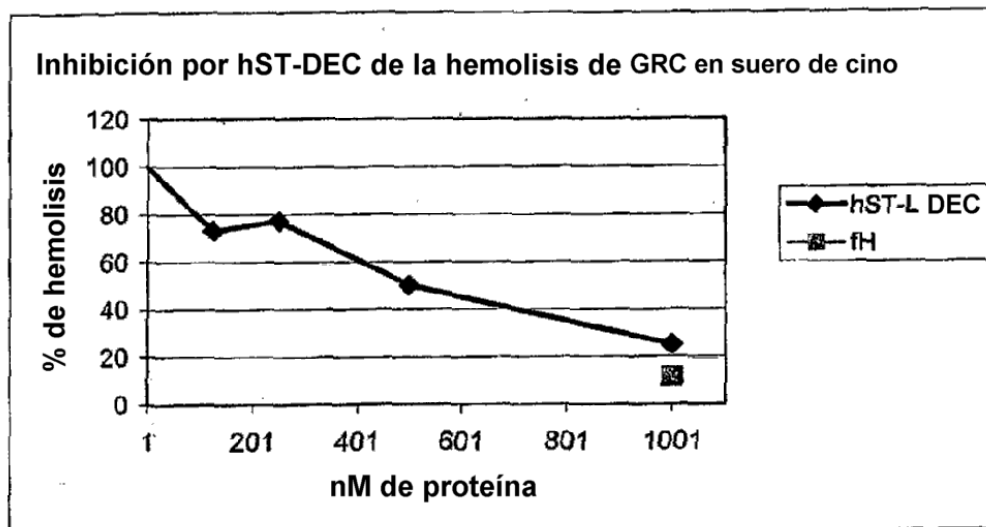


Figura 63B

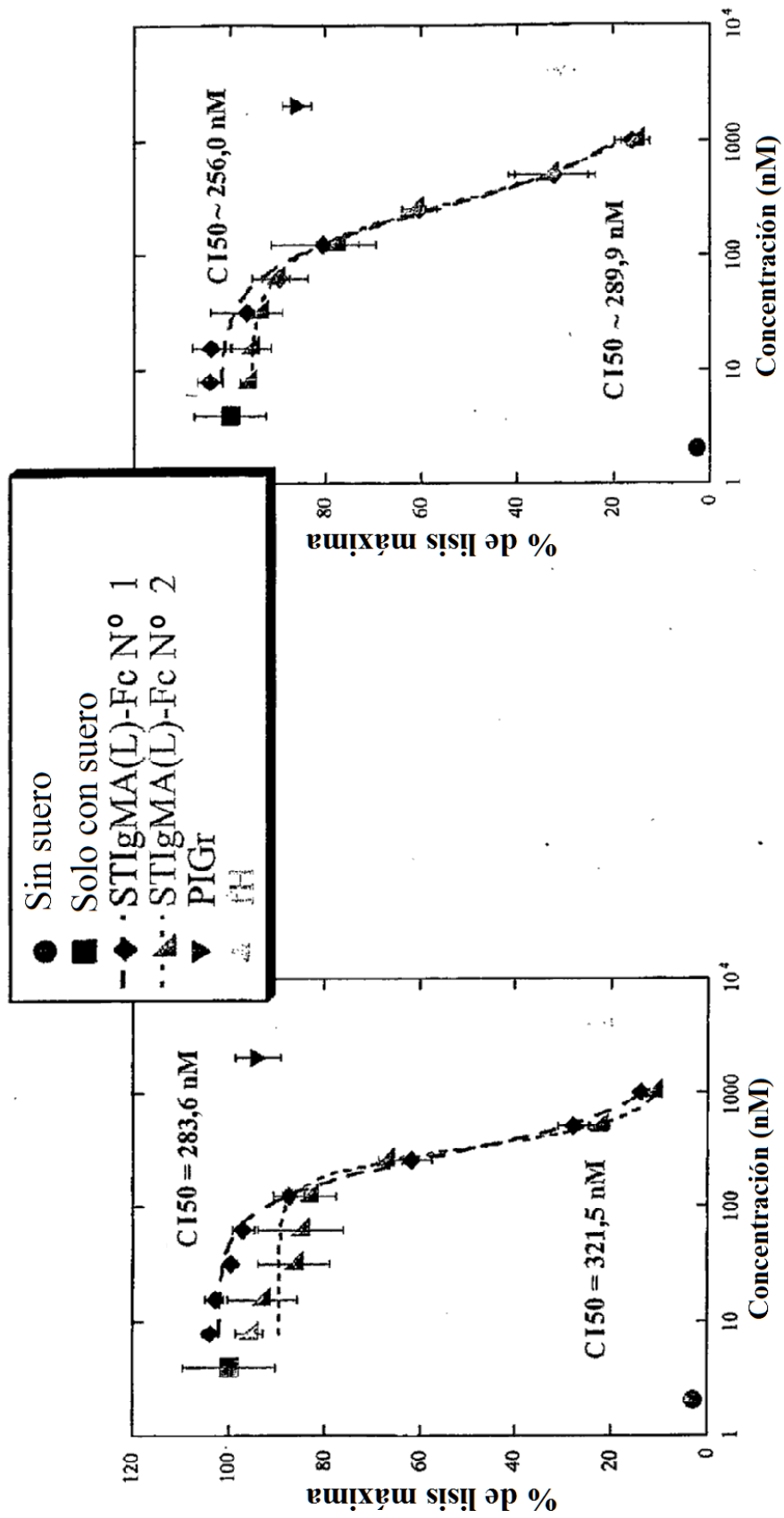


Figura 64

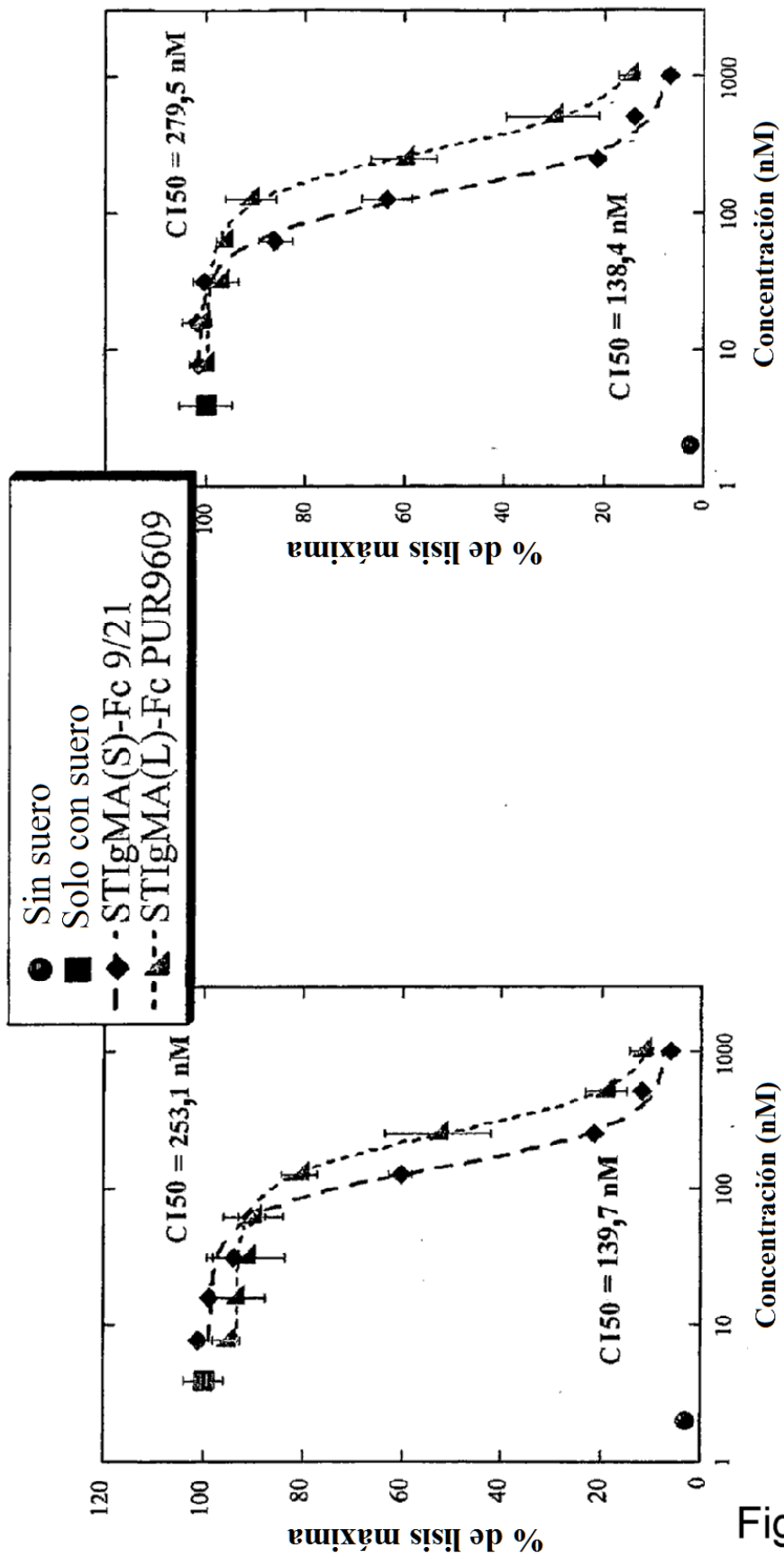


Figura 65

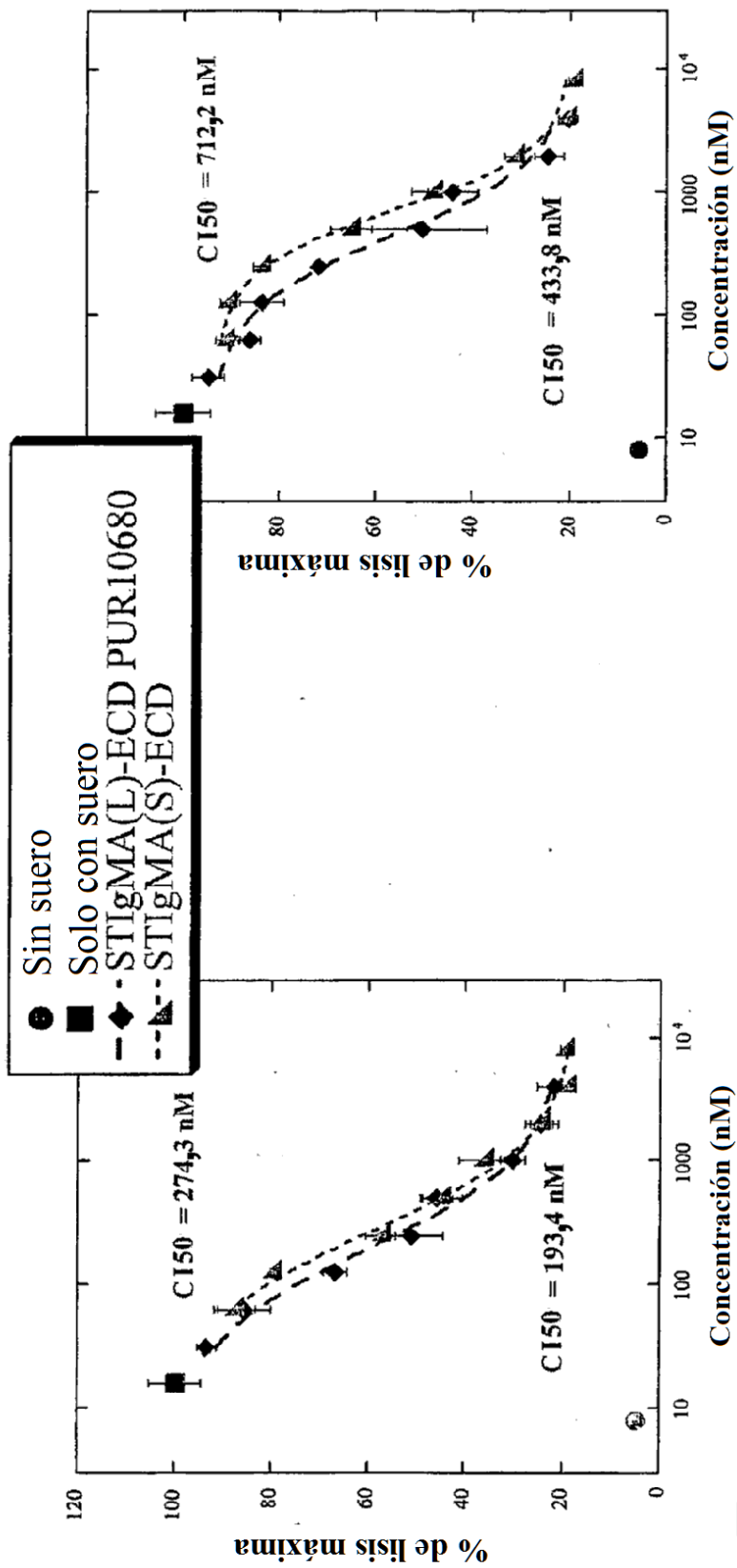


Figura 66

```

><Cla {subrayado=1-5, dir=f, 5etiqueta=}>ATCCGATTAAACCACC
><Met {trans=1-s, dir=f, res=1}>
ATGGGGATCTTACTGGGCCTGCTACTCCTGGGGCACCTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATC
CTGGAAGTGCCAGA
GAGTGTAACAGGACCTTGAAAGGGGATGTGAATCTTCCCTGCACCTATGACCCCTGCAAGGCTA
CACCCAAGTCTTGG
TGAAGTGGCTGGTACAACGTGGCTCAGACCCTGTCACCATCTTTCTACGTGACTCTTCTGGAGACCA
TATCCAGCAGGCA
AAGTACCAGGGCCGCCTGCATGTGAGCCACAAGGTTCCAGGAGATGTATCCCTCCAATTGAGCACC
CTGGAGATGGATGA
CCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGATGGCAACCAAGTCGTGAGAGATAA
GATTACTGAGCTCC
GTGTCCAGAACTCTCTGTCTCCAAGCCCACAGTGACAACCTGGCAGCGGTTATGGCTTCACGGTGC
CCGAGGGAATGAGG
ATTAGCCTTCAATGCCAGGCTCGGGGTTCTCCTCCCATCAGTTATATTTGGTATAAGCAACAGACTAA
TAACCAGGAACC
CATCAAAGTAGCAACCCTAAGTACCTTACTCTTCAAGCCTGCGGTGATAGCCGACTCAGGCTCCTAT
TTCTGCATGCCA
AGGGCCAGGTTGGCTCTGAGCAGCACAGCGACATTGTGAAGTTTGTGGTCAAAGACTCC
><Inicio de hlg1 - región enlazadora (DKHT)>
GATAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, 5etiqueta=}>
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACCTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA
><extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, 5etiqueta=}>
TGAGTGCGACGGCCCTAGA
><Sal {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
GTCGACCTGCAGAAGCT
><Xba>
TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

```

Figura 67

```

><Cla {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}> ATCGATTAAACCACC
><Met {trans=1-s, dir=f, res=1}>
ATGGGGATCTTACTGGGCCTGCTACTCCTGGGGCACCTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATC
CTGGAAGTGCCAGA
GAGTGTAAACAGGACCTTGGAAGGGGATGTGAATCTTCCCTGCACCTATGACCCCTGCAAGGCTA
CACCCAAGTCTTGG
TGAAGTGGCTGGTACAACGTGGCTCAGACCCTGTCACCATCTTTCTACGTGACTCTTCTGGAGACCA
TATCCAGCAGGCA
AAGTACCAGGGCCGCTGCATGTGAGCCACAAGGTTCCAGGAGATGTATCCCTCCAATTGAGCACC
CTGGAGATGGATGA
CCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGATGGCAACCAAGTCGTGAGAGATAA
GATTACTGAGCTCC
GTGTCCAGAACTCTCTGTCTCCAAGCCCACAGTGACAACTGGCAGCGGTTATGGCTTCACGGTGCC
CCCAGGGAATGAGG
ATTAGCCTTCAATGCCAGGCTCGGGGTTCTCCTCCCATCAGTTATATTTGGTATAAGCAACAGACTAA
TAACCAGGAACC
CATCAAAGTAGCAACCCTAAGTACCTTACTCTTCAAGCCTGCGGTGATAGCCGACTCAGGCTCCTAT
TTCTGCACTGCCA
AGGGCCAGGTTGGCTCTGAGCAGCACAGCGACATTGTGAAGTTTGTGGTCAAAGACTCCTCAAAGC
TACTCAAGACCAAG
ACTGAGGCACCTACAACCATGACATACCCCTTGAAAGCAACATCTACAGTGAAGCAGTCCTGGGACT
><Cebador mutagénico {subrayado=1-52, dir=f, 5etiqueta=}>
GGACCACTGACATG
><inicio de hlg1 - región enlazadora (DKHT)>
GATAAACTCACACATGCCACCGTGCCGAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, 5etiqueta=}>
ATAATGCCAAGACAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCTGCAACAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTGAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACCTAC
AAGACCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA
><extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, 5etiqueta=}>
TGAGTGCGACGGCCCTAGA
><Sal {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
GTCGACCTGCAGAAGCT
><Xba>
TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

```

Figura 68

```

><Cla {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>ATCGATTAAACCACC
><Met {trans=1-s, dir=f, res=1}>
ATGGGGATCTTACTGGGCCTGCTACTCCTGGGGCACCTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATC
CTGGAAGTGCCAGA
GAGTGTAACAGGACCTTGAAAGGGGATGTGAATCTTCCCTGCACCTATGACCCCCTGCAAGGCTA
CACCCAAGTCTTGG
TGAAGTGGCTGGTACAACGTGGCTCAGACCCTGTCACCATCTTTCTACGTGACTCTTCTGGAGACCA
TATCCAGCAGGCA
AAGTACCAGGGCCGCTGCATGTGAGCCACAAGGTTCCAGGAGATGTATCCCTCCAATTGAGCACC
CTGGAGATGGATGA
CCGGAGCCACTACAGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGATGGCAACCAAGTCGTGAGAGATAA
GATTACTGAGCTCC
GTGTCCAGAAACACTCC
>< inicio de hlgG1 - región enlazadora (DKHT) {subrayado=1-15, dir=f, 5etiqueta=}>
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, 5etiqueta=}>
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTGAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA
>< extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, 5etiqueta=}>
TGAGTGCGACGGCCCTAGA
><Sal {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
GTCGACCTGCAGAAGCT
><Xba>
TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

```

Figura 69

A
 ><enlazador de clonación>
 CCTCGGTTCT
 ><Cla {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
 ATCGATGCTCTCAATAAACACC
 ><MET>
 ><ADN185041_ClaI_F_5'etiqueta :ttttttatcgattaaaccacc {subrayado=1-24, dir=f, 5etiqueta=}>
 <Comentario {trans=1-s, dir=f, res=1}>
 ATGGGGATCTTACTGGGCCTGCTACTCCTGGGGCACCTAACAGTGGACACTTATGGCCGTCCCATC
 CTGGAAGTGCCAGA
 GAGTGTAACAGGACCTTGGAAAGGGGATGTGAATCTTCCCTGCACCTATGACCCCTGCAAGGCTA
 CACCCAAGTCTTGG
 TGAAGTGGCTGGTACAACGTGGCTCAGACCCTGTCAACCATCTTTCTACGTGACTCTTCTGGAGACCA
 TATCCAGCAGGCA
 AAGTACCAGGGCCGCTGCATGTGAGCCACAAGGTTCCAGGAGATGTATCCCTCCAATTGAGCACC
 CTGGAGATGGATGA
 CCGGAGCCACTACAGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGATGGCAACCAAGTCGTGAGAGATAA
 GATTACTGAGCTCC
 GTGTCCAGAAACACTCCTCAAAGCTACTCAAGACCAAGACTGAGGCACCTACAACCATGACATACCC
 CTTGAAAGCAACA
 TCTACAGTGAAGCAGTCCTGGGACTGGACCACTGACATG
 >< inicio de hlg1 - región enlazadora (DKHT) {subrayado=1-15, dir=f, 5etiqueta=}>
 GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCCCTAAACC
 CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ><Fc 3-1 {subrayado=1-29, dir=b, 5etiqueta=}>
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
 CCGTCTGCACCAAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
 AAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCA
 AGAACCAGGTACGCC
 TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
 CCGGAGAACAACCTAC
 AAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTGTCTC
 CGGGTAAA
 >< extremo h Fc {subrayado=1-3, dir=f, 5etiqueta=}>
 TGAGTGCGACGGCCCTAGA
 ><Sal {subrayado=1-6, dir=f, 5etiqueta=}>
 GTCGACCTGCAGAAGCT
 ><Xba>
 TCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCT

Figura 70

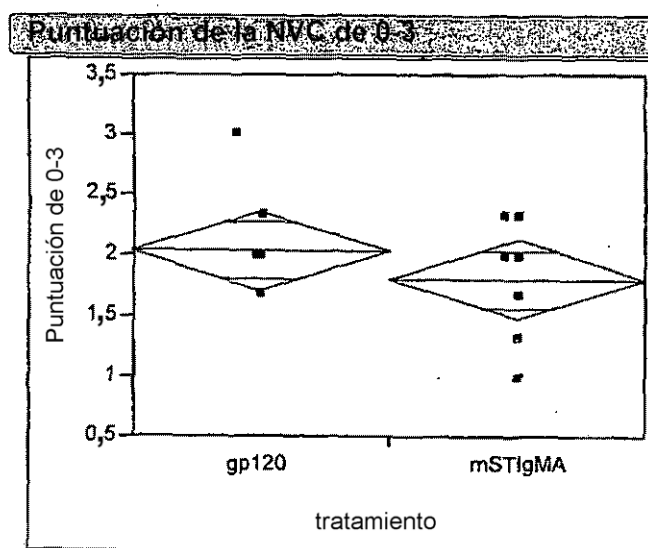


Figura 71A

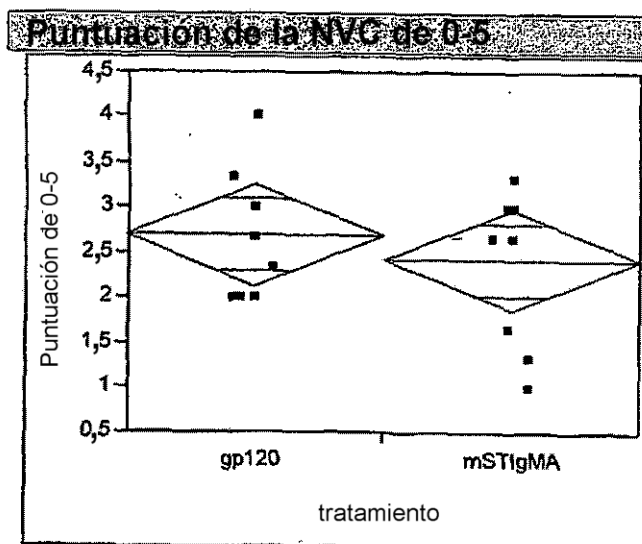


Figura 71B