

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 639**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2005 E 05748982 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 1766033**

54 Título: **Células y mamíferos no humanos modificados genéticamente**

30 Prioridad:

**10.06.2004 GB 0412966**

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

**13.05.2015**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF LEICESTER (100.0%)  
RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT  
OFFICE, UNIVERSITY ROAD  
LEICESTER LE1 7RH, GB**

72 Inventor/es:

**FUJITA, TEIZO;  
SCHWAEBLE, HANS-WILHELM y  
STOVER, CORDULA MARGARET**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 535 639 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**

Células y mamíferos no humanos modificados genéticamente

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a mamíferos no humanos modificados genéticamente, en particular a roedores modificados genéticamente, tales como ratones, que no producen cantidad alguna de polipéptido endógeno serina-  
 10 proteasa-2 asociado a la lectina fijadora de manano (MASP-2). La invención se refiere también a células no humanas modificadas genéticamente, en particular células del tallo embrionario, especialmente células de roedores tales como células de ratón, que no producen cantidad alguna del polipéptido MASP-2 endógeno. La invención se refiere también a células no humanas modificadas genéticamente, en particular células del tallo embrionario y  
 15 mamíferos no humanos modificados genéticamente producidos a partir de ellas, y su uso en la producción de mamíferos y células no humanas de los cuales se han delecionado o desorganizado dentro del genoma los genes endógenos MASP-2. Aspectos de la invención se refieren también a mamíferos y células no humanos modificados genéticamente que no producen cantidad alguna de proteína 19 endógena asociada a lectina fijadora de manano (MAp 19).

**Antecedentes de la invención**

20 El sistema del complemento proporciona un mecanismo de acción temprana para iniciar y ampliar la respuesta inflamatoria a la infección microbiana y otras agresiones agudas (Liszewski, M.K. y J.P. Atkinson, 1993, en Fundamental Immunology, tercera edición, editado por W.E. Paul, Raven Press, Ltd., Nueva York). Si bien la activación del complemento proporciona una defensa valiosa de primera línea contra patógenos potenciales, las actividades del complemento que promueven una respuesta inflamatoria protectora pueden representar también una  
 25 amenaza potencial para el hospedador (Kalli, K.R., et al., Springer Semin. Immunopathol. 15:417- 431, 1994; Morgan, B.P., Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Por ejemplo, los productos proteolíticos de C3 y C5 reclutan y activan los neutrófilos. Estas células activadas están indiscriminadas en su liberación de enzimas destructoras y pueden causar deterioro orgánico. Además, la activación del complemento puede causar la deposición de componentes líticos del complemento en las células hospedadoras cercanas así como en las dianas microbianas, dando como resultado lisis de las células hospedadoras.

30 El sistema del complemento se ha visto implicado como contribuyente a la patogénesis de numerosos estados de enfermedad agudos y crónicos, que incluyen: infarto de miocardio, revascularización subsiguiente a derrame cerebral, ARDS, lesión de reperfusión, choque séptico, fuga capilar subsiguiente a quemaduras térmicas, inflamación pos-derivación cardiopulmonar, rechazo de trasplantes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, y enfermedad de Alzheimer. En la práctica totalidad de estas afecciones, el complemento no es la causa, pero es uno de los varios factores implicados en la patogénesis. Sin embargo, la activación del complemento puede ser un mecanismo patológico importante y representa un punto eficaz para control clínico en muchos de estos estados de enfermedad. El reconocimiento creciente de la importancia de una lesión tisular mediada por el complemento en  
 35 una diversidad de estados de enfermedad pone de manifiesto la necesidad de fármacos eficaces inhibidores del complemento. No ha sido aprobado fármaco alguno para uso humano que esté dirigido a e inhiba específicamente la activación del complemento.

40 En la actualidad, está aceptado generalmente que el sistema del complemento puede ser activado por 3 vías distintas: la vía clásica, la vía de lectina, y la vía alternativa. La vía clásica se desencadena usualmente por fijación de anticuerpo a una partícula extraña (es decir, un antígeno), y requiere por tanto exposición previa a dicho antígeno para la generación del anticuerpo específico. Dado que la activación de la vía clásica está asociada con el desarrollo de una respuesta inmune, la vía clásica forma parte del sistema inmune adquirido. En contraste, tanto la vía de lectina como la vía alternativa son independientes de la inmunidad clonal y forman parte del sistema inmune innato.

45 El primer paso en la activación de la vía clásica es la fijación de una molécula de reconocimiento específica, C1q, a las IgG e IgM fijadas al antígeno. La activación del sistema del complemento da como resultado la activación secuencial de zimógenos serina-proteasa. C1q está asociada con las proenzimas serina-proteasa C1r y C1s como un complejo denominado C1 y, después de la fijación de C1q a un complejo inmune, la escisión auto-proteolítica del sitio Arg-Ile de C1r va seguida por la activación por C1r de C1s, que adquiere con ello la capacidad de escindir C4 y C2. La escisión de C4 en dos fragmentos, designados C4a y C4b permite que los fragmentos C4b formen enlaces covalentes con grupos hidroxilo o amino adyacentes y la generación subsiguiente de la convertasa C3 (C4b2b) por  
 50 interacción no covalente con el fragmento C2b de C2 activado. La convertasa C3 (C4b2b) activa C3 conduciendo a la generación de la convertasa C5 (C4b2b3b) y la formación del complejo de ataque de la membrana (C5b-9) que puede causar lisis microbiana. Las formas activadas de C3 y C4 (C3b y C4b) se depositan covalentemente en las superficies diana extrañas, que son reconocidas por receptores del complemento en fagocitos múltiples.

55 Independientemente, el primer paso en la activación del sistema del complemento por la vía de lectina es también la fijación de moléculas de reconocimiento específicas, que va seguida por la activación de serina-proteasas asociadas. Sin embargo, más bien que la fijación de cotejos inmunes por C1q, las moléculas de reconocimiento en la

vía de lectina son proteínas séricas fijadoras de carbohidratos (lectina fijadora de manano (MBL), ficolina H, ficolina M, y ficolina L) (Lu, J., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, 2002). Ikeda et al. demostraron por primera vez que, al igual que C1q, MBL podría activar el sistema del complemento después de fijación a eritrocitos recubiertos de manano de levadura de una manera dependiente de C4 (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987). MBL, un miembro de la familia de proteínas colectinas, es una lectina dependiente de calcio que fija carbohidratos con 3 y 4 grupos hidroxí orientados en el plano ecuatorial del anillo de piranosa. Ligandos prominentes para MBL son por tanto D-manosa y N-acetil-D-glucosamina, mientras que los carbohidratos que no se ajustan a este requerimiento estérico tienen afinidad indetectable para MBL (Weis, W.I., et al., *Nature* 360:127-134, 1992). La interacción entre MBL y los azúcares monovalentes es extremadamente débil, con constantes de disociación comprendidas típicamente en el campo 2 mM. MBL consigue la fijación fuerte específica a ligandos glucano por interacción simultánea con residuos monosacáridos múltiples (Lee, R.T., et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, 1992). MBL reconoce los patrones de carbohidrato que decoran comúnmente microorganismos tales como bacterias, levadura, parásitos y ciertos virus. En contraste, MBL no reconoce D-galactosa y ácido siálico, los azúcares penúltimo y último que decoran usualmente los glicoconjugados complejos 'maduros' presentes en las glicoproteínas plasmáticas y de la superficie celular de los mamíferos. Se cree que esta especificidad de fijación contribuye a la protección contra la autoactivación. Sin embargo, MBL se fija de hecho con afinidad alta a agrupaciones de glucanos 'precursores' ricos en manosa en las glicoproteínas unidas a N y los glicolípidos secuestrados en el retículo endoplásmico y el Golgi de las células de mamífero (Maynard, Y., et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, 1982). Por tanto, las células deterioradas son dianas potenciales para la activación de la vía de lectina por fijación de MBL.

Las ficolinas poseen un tipo de dominio de lectina diferente de MBL, denominado el dominio de tipo fibrinógeno. Las ficolinas fijan residuos azúcar de una manera independiente de  $Ca^{++}$ . En los humanos, se han identificado tres clases de ficolinas, ficolina L, ficolina M y ficolina H. Las dos ficolinas del suero ficolina L y ficolina H tienen en común una especificidad para N-acetil-D-glucosamina; sin embargo, la ficolina H se fija también a N-acetil-D-galactosamina. La diferencia en especificidad de azúcares de ficolina L, ficolina H y MBL significa que las diferentes lectinas pueden ser complementarias y estar dirigidas a glicoconjugados diferentes, aunque solapantes. Este concepto está respaldado por un informe reciente según el cual, de las lectinas conocidas en la vía de lectina, únicamente ficolina L se fija específicamente a ácido lipoteicoico, un glicoconjugado de la pared celular que se encuentra en todas las bacterias Gram-positivas (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol* 172:1198-1202, 2004). Las colectinas (es decir, MBL) y las ficolinas no guardan semejanza importante alguna en secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los dos grupos de proteínas tienen organizaciones de dominios similares y, al igual que C1q, se ensamblan en estructuras oligómeras, que maximizan la posibilidad de fijación a sitios múltiples. Las concentraciones de MBL en suero son muy variables en las poblaciones sanas y esto está controlado genéticamente por polimorfismo y mutaciones en ambas regiones promotora y codificante del gen MBL. Como una proteína de fase aguda, la expresión de MBL está regulada además en sentido creciente durante la inflamación. La ficolina L está presente en el suero a concentraciones similares a las de MBL. Por tanto, la rama de ficolina L de la vía de lectina es potencialmente comparable a la rama de MBL en fuerza. MBL y las ficolinas pueden funcionar también como opsoninas, que requieren la interacción de estas proteínas con receptores fagocitos (Kuhlman, M., et al., *J. Exp Med.* 169:1733, 1989; Matsushita, M., et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, 1996). Sin embargo, las identidades del receptor o receptores en las células fagocíticas no han sido establecidas.

La MBL humana forma una interacción específica y de afinidad alta a través de su dominio de tipo colágeno con las serina-proteasas de tipo C1r/C1s, denominadas serina-proteasas asociadas a MBL (MASPs). Hasta la fecha, se han descrito tres MASPs. En primer lugar, se identificó una sola enzima "MASP" y se caracterizó como la enzima responsable de la iniciación de la cascada del complemento (es decir, la escisión de C2 y C4) (Ji, Y.H., et al., *J. Immunol.* 150:571-578, 1993). Más tarde, resultó que MASP es de hecho una mezcla de dos proteasas: MASP-1 y MASP-2 (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510, 1997). Sin embargo, se demostró que el complejo MBL-MASP-2 es suficiente por sí solo para activación del complemento (Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, 2000). Adicionalmente, sólo MASP-2 escinde C2 y C4 a tasas altas (Ambrus, G., et al., *J. Immunol.* 170:1374-1382, 2003). Por tanto, MASP-2 es la proteasa responsable de la activación de C4 y C2 para generar la convertasa C3, C4b2a. Ésta es una diferencia importante del complejo C1, en el que la acción coordinada de dos serina-proteasas específicas (C1r y C1s) conduce a la activación del sistema del complemento. Recientemente, ha sido aislada una tercera proteasa nueva, MASP-3 (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001). MASP-1 y MASP-3 son productos del mismo gen remodelados alternativamente (Stover et al., *Genes and Immunity* 4: 374-384 (2003). Las funciones biológicas de MASP-1 y MASP-3 no están definidas aún.

Las MASPs comparten organizaciones de dominios idénticas con las de C1r y C1s, los componentes enzimáticos del complejo C1 (Sim, R.B., et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, 2000). Estos dominios incluyen un dominio N-terminal C1r/C1s/erizo de mar/proteína morfogénica ósea (CUB), un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un segundo dominio CUB, un tándem de dominios de proteínas de control del complemento, y un dominio de serina-proteasa. Como en las proteasas C1, la activación de MASP-2 ocurre por escisión de un enlace Arg-Ile adyacente al dominio de serina-proteasa, que divide la enzima en cadenas A y B enlazadas por disulfuro, estando constituidas las últimas por el dominio de serina-proteasa. Recientemente, se ha descrito una deficiencia de MASP-2 determinada

genéticamente (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New Eng. J. Med.* 349:554-560, 2003). La mutación de un solo nucleótido conduce a un intercambio Asp-Gly en el dominio CUB1 y hace que MASP-2 sea incapaz de fijarse a MBL.

5 MBL está asociada también con una proteína no enzimática a la que se hace referencia como proteína de 19 kDa asociada a MBL (MAp19) (Stover, C.M., *J. Immunol.* 162:3481-90, 1999) o proteína pequeña asociada a MBL (sMAP) (Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863, 1999). MAp19 se forma por remodelación alternativa del producto del gen *MASP2* y comprende los dos primeros dominios de MASP-2, seguidos por una secuencia extra de cuatro aminoácidos singulares. La función biológica de MAp-19 se desconoce. Los genes *MASP 1* y *MASP2* están localizados en los cromosomas 3 y 1, respectivamente (Schwaeble, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466, 2002).

10 Varias líneas de evidencia sugieren que existen diferentes complejos MBL-MASPs y que una gran fracción de las MASPs totales no está complejada con MBL (Thiel, S., et al., *J. Immunol.* 165:878-887, 2000). Tanto la ficolina H como la ficolina L están asociadas con MASP y activan la vía del complemento de lectina, como lo hace MBL (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). Ambas vías de lectina y clásica forman una convertasa C3 común (C4b2a) y las dos vías convergen en este paso.

15 Se cree generalmente que la vía de lectina desempeña un papel importante en la defensa del hospedador contra la infección. Una evidencia fuerte de la implicación de MBL en la defensa del hospedador proviene del análisis de pacientes con niveles reducidos de MBL funcional en suero (Kilpatrick, D.C., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, 2002). Tales pacientes exhiben susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes. Estos síntomas son evidentes usualmente al principio de su vida, durante una ventana aparente de vulnerabilidad a medida que disminuye el título de anticuerpos derivados por vía materna, pero antes que se desarrolle un repertorio pleno de respuestas de anticuerpos. Este síndrome es a menudo resultado de mutaciones en varios sitios en la porción de colágeno de la MBL, que interfieren con la formación apropiada de oligómeros de MBL. Sin embargo, dado que MBL puede funcionar como una opsonina independiente del complemento, se desconoce en qué proporción la susceptibilidad incrementada a la infección es debida a activación deteriorada del complemento.

25 Aunque existen abundantes pruebas que implican ambas vías clásica y alternativa del complemento en la patogénesis de enfermedades humanas no infecciosas, el papel de la vía de lectina está precisamente comenzando a ser evaluado. Estudios recientes proporcionan evidencia de que la activación de la vía de lectina puede ser responsable de la activación del complemento y la inflamación afin en la lesión isquemia/reperfusión. Collard et al. (2000) informaron que las células endoteliales cultivadas sometidas a estrés oxidante fijan MBL y exhiben deposición de C3 después de exposición a suero humano (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, 2000). Adicionalmente, el tratamiento de sueros humanos con anticuerpos monoclonales anti-MBL bloqueantes inhibía la fijación de MBL y la activación del complemento. Estos descubrimientos se extendieron a un modelo de rata de isquemia de miocardio-reperfusión en el cual las ratas tratadas con un anticuerpo bloqueante dirigido contra MBL de rata exhibían significativamente menos deterioro del miocardio después de oclusión de una arteria coronaria que las ratas tratadas con un anticuerpo de control (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413-1418, 2001). El mecanismo molecular de la fijación de MBL al endotelio vascular después de estrés oxidante no está claro; un estudio reciente sugiere que la activación de la vía de lectina después de estrés oxidante puede estar mediada por la fijación de MBL a citoqueratinas endoteliales vasculares, y no a glicoconjugados (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, 2001). Otros estudios han implicado las vías clásica y alternativa en la patogénesis de la lesión isquemia/reperfusión y el papel de la vía de lectina en esta enfermedad sigue siendo objeto de controversia (Riedemann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).

40 En contraste con las vías clásica y de lectina, no se ha encontrado iniciador alguno de la vía alternativa que cumpla las funciones de reconocimiento que desempeñan C1q y las lectinas en las otras dos vías. Actualmente está aceptado en general que la vía alternativa está activada espontáneamente por superficies extrañas u otras superficies anormales (bacterias, levaduras, células infectadas viralmente, o tejido deteriorado). Existen cuatro proteínas plasmáticas implicadas directamente en la vía alternativa: C3, los factores B y D, y properdina. La generación proteolítica de C3b a partir de C3 nativa es necesaria para el funcionamiento de la vía alternativa. Dado que la convertasa C3 de la vía alternativa (C3bBb) contiene C3b como subunidad esencial, la cuestión concerniente al origen de la primera C3b por la vía alternativa ha sido un problema desconcertante y ha estimulado considerables investigaciones.

50 C3 pertenece a una familia de proteínas (junto con C4 y  $\alpha$ -2-macroglobulina) que contienen una modificación rara posterior a la traducción, conocida como un enlace tioéster. El grupo tioéster está compuesto de una glutamina cuyo grupo carbonilo terminal está unido al grupo sulfhidrilo de una cisteína situada a una distancia de tres aminoácidos. Este enlace es inestable y el grupo electrófilo carbonilo de la glutamina puede formar un enlace covalente con otras moléculas por la vía de grupos hidroxilo o amino. El enlace tioéster es razonablemente estable cuando está sequestrado dentro de una bolsa hidrófoba de C3 intacta. Sin embargo, la escisión proteolítica de C3 a C3a y C3b da como resultado la exposición del enlace tioéster altamente reactivo en C3b y por este mecanismo C3b se une covalentemente a una diana. Además de su bien documentado papel en la unión covalente de C3b a las dianas del complemento, se cree también que el tioéster de C3 tiene un papel central en la activación de la vía alternativa. Conforme a la generalmente aceptada "teoría de la marcha en vacío" la vía alternativa es iniciado por la generación

de una convertasa en fase fluida, C3bBb, que se forma a partir de C3 con tioéster hidrolizado (C3b; C3H2O) y factor B (Lachmann, P.J., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7:143-162, 1984). La iC3 de tipo C3b se genera a partir de C3 nativa por una hidrólisis espontánea lenta del tioéster interno en la proteína (Pangbum, M.K., et al., J. Exp. Med. 154:856-867, 1981). Por la actividad de la convertasa C3bBb, se depositan moléculas C3b en la superficie de la diana, iniciando con ello la vía alternativa.

Se conoce muy poco acerca de los iniciadores de activación de la vía alternativa. Se cree que los activadores incluyen paredes de células de levadura (zimosán), muchos polisacáridos puros, eritrocitos de conejo, ciertas inmunoglobulinas, virus, hongos, bacterias, células tumorales animales, parásitos, y células deterioradas. La única característica común a estos activadores es la presencia de carbohidrato, pero la complejidad y diversidad de las estructuras de carbohidrato ha hecho difícil establecer los determinantes moleculares compartidos, que están reconocidos.

La vía alternativa puede proporcionar también un bucle de amplificación potente para la convertasa C3 de las vías lectina/clásica (C4b2b) dado que cualquier C3b generada puede participar con factor B en la formación de convertasa C3 adicional de la vía alternativa (C3bBb). La convertasa C3 de la vía alternativa es estabilizada por la fijación de properdina. La properdina prolonga la semivida de la convertasa C3 de la vía alternativa de 6 a 10 veces. La adición de C3b a la convertasa C3 conduce a la formación de la convertasa C5 de la vía alternativa.

Se ha pensado que las tres vías (es decir, las vías clásica, de lectina y alternativa) convergen en C5, que se escinde para formar productos con efectos proinflamatorios múltiples. La vía de convergencia ha sido denominada como la vía terminal del complemento. C5a es la anafilatoxina más potente, induciendo alteraciones en la musculatura lisa y el tono vascular, así como la permeabilidad vascular. Es también una quimiotaxina y activadora potente tanto de neutrófilos como de monocitos. La activación celular mediada por C5a puede amplificar significativamente las respuestas inflamatorias por inducción de la liberación de mediadores de inflamación múltiples adicionales, que incluyen citocinas, enzimas hidrolíticas, metabolitos de ácido araquidónico y especies de oxígeno reactivas. La escisión de C5 conduce a la formación de C5b-9, conocido también como complejo de ataque de la membrana (MAC). Existen ahora pruebas sólidas de que la deposición subclítica de MAC puede jugar un papel importante en la inflamación además de su papel como complejo lítico formador de poros.

El documento publicado por Takahashi M et al (2002), International Immunopharmacology, vol.2 no.9, página 1220, & XIX International Complement Workshop; Palermo, Italia, septiembre 22-26, 2002, describe ratones empobrecidos en MASP-1.

El documento publicado por Casanova J-L et al (2004), Journal of Experimental Medicine, vol.199 pp.1295-1299 describe ratones MBL-A/MBL-B desactivados genéticamente.

El documento WO 0206460 describe péptidos de MASP-2 y usos de los mismos.

Los autores de la invención han creado ahora un organismo desactivado con una desorganización deliberada del gen MASP-2, y que es deficiente en la vía del complemento de lectina. Tales organismos son útiles como modelo para estudiar el papel de la deficiencia en la vía de lectina en la salud y la enfermedad. Los organismos son potencialmente útiles como modelos experimentales para trastornos tales como lesión de reperfusión, infarto de miocardio, derrame cerebral, y trasplante. Los organismos pueden ser útiles también para la producción de anticuerpos contra MASP-2 humana para uso como herramienta terapéutica. Los inventores han producido también organismos que son deficientes en producción de MAP 19.

Conforme a lo anterior, se describe en esta memoria un mamífero no humano modificado genéticamente o una célula de mamífero no humana modificada genéticamente caracterizado(a) por que no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifique por sí misma un polipéptido MASP-2 endógeno. Se describe también un ratón modificado genéticamente o transgénico en el que las zonas germinales contienen un gen MASP-2 desorganizado. Se describe además un ratón transgénico modificado genéticamente o la progenie del mismo, en donde las células somáticas y germinales están exentas de MASP-2 endógeno.

En una forma, el mamífero o célula no humano modificado(a) genéticamente no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por sí misma un polipéptido MASP-2.

En su sentido más amplio, la invención es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención proporciona un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente, caracterizado por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y o el gen que codifica el polipéptido MAP 19 endógeno está/están ausente(s) o parcialmente ausente(s) o desorganizado(s) de tal modo que no se produce el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor y/o MAP19 endógeno de roedor.

En esta memoria, endógeno se define como auténtico, nativo, no extraño y no modificado por ingeniería genética tal como direccionamiento de genes o introducción de genes.

Mamíferos o células no humanos modificados genéticamente pueden obtenerse por delección deliberada de todas o esencialmente todas las secuencias endógenas del gen MASP-2. La delección puede ser de todos los genes endógenos MASP-2 y las secuencias intercaladas (eliminación completa o delección limpia de exones/intrones) o esencialmente todas las secuencias endógenas de MASP-2 por delección de una parte extensa de la secuencia del gen MASP-2 endógena de tal modo que se impide la expresión del gen MASP-2. La delección deliberada puede realizarse por un proceso de recombinación homóloga, o por un proceso de recombinación-escisión, por ejemplo por recombinación Cre-loxP. Así, se describen también un mamífero no humano modificado genéticamente o transgénico como se describe en esta memoria o una célula de mamífero no humano modificada genéticamente o transgénica, preferiblemente una célula del tallo embrionario como se describe en esta memoria, que puede obtenerse por un método de recombinación homóloga.

El sistema de recombinación Cre-loxP se describe en Zou et al (Science, 1993; 262, 1271-1274). Éste describe un sistema que opera en células de mamífero y ha sido utilizado para experimentos de direccionamiento de genes en el ratón a fin de generar delecciones "limpias" de genes diana en la línea germinal, y para desactivar genes de una manera condicional (basada en expresión regulada de la recombinasa Cre).

Cre es una proteína recombinasa de 38 kDa del bacteriófago P1 quien media la recombinación intramolecular (causante de escisión o de inversión) e intermolecular (integradora) de acción específica entre sitios loxP; para una revisión del sistema se remite a Sauer en Methods of Enzymology; 1993, Vol. 225, 890-900. Un sitio loxP (el locus del entrecruzamiento) está constituido por dos repeticiones invertidas de 13 pb separadas por una región espaciadora asimétrica de 8 pb. Una molécula Cre se fija por repetición invertida, o dos moléculas Cre se alinean en un sitio loxP. La recombinación ocurre en la región espaciadora asimétrica. Las 8 bases citadas son responsables también de la direccionalidad del sitio. Dos secuencias loxP en orientación opuesta una respecto a otra invierten la pieza intermedia de DNA, y dos sitios en orientación directa dictan la escisión del DNA intermedio entre ambos sitios, dejando atrás un sitio loxP. Esta eliminación precisa del DNA puede utilizarse también para eliminar genes (delección de genes) o para activar genes. El sistema Cre-loxP puede utilizarse también para introducir genes (introducción de genes). Un gen flanqueado por dos sitios loxP en orientación directa se conoce como un "gen flojado").

Zou et al (Current Biology 1994; 4: (12) 1099 - 2003) describen el uso del sistema Cre-loxP en células del tallo embrionario de ratón para reemplazar el gen de ratón Cg1, que codifica la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos IgG1, con el gen humano Cg1 correspondiente. Se generó un constructo de direccionamiento en el cual un sitio loxP estaba clonado en el extremo 3' de la secuencia del gen diana (en este caso el Cg1 de ratón) y, en una posición 5' del gen diana, se realizó una inserción de (desde 5' a 3') un gen mutante de interés (en este caso Cg1 humano), un sitio loxP, un marcador de selección negativo (HSV-tk) y un marcador de selección positivo (neo<sup>R</sup>). En el constructo, los sitios loxP estaban en orientación directa. El constructo de direccionamiento se introdujo por transfección en células ES, y se seleccionaron transformantes en G418 por resistencia a neomicina. Se introdujo un constructo Cre en las células transformadas para conseguir expresión transitoria de Cre. La recombinación, es decir la escisión de la secuencia entre los dos sitios loxP (HSV-tk codificante, neo<sup>R</sup> y el Cg1 de ratón del gen diana endógeno), ocurría únicamente en las células que expresaban recombinasa Cre. La secuencia Cg1 humana estaba situada fuera de los sitios loxP y se mantenía por tanto insertada dentro del genoma de ratón. Se utilizó selección negativa empleando Aciclovir o Ganciclovir a fin de identificar aquellas células en las cuales había tenido lugar la delección, dado que únicamente las células que no expresan HSV-tk, es decir aquellas en las cuales se ha delecionado también el gen Cg1 endógeno de ratón, eran capaces de sobrevivir en tales medios.

Por ello, Zou et al (1994) utilizaron el sistema Cre-loxP para introducir un gen Cg1 humano y delecionaron luego un gen de la región constante de la cadena pesada de Ig endógena simple, Cg1. Los exones que codificaban las porciones transmembranal y citoplásmica del Cg1 de ratón IgH no se reemplazaron por secuencias humanas, y éstas se retuvieron a fin de minimizar el riesgo de perturbación de la expresión de la membrana y señalización de la IgG1 humanizada en el ratón. El gen Cg1 humano introducido se transmitió a lo largo de la línea germinal del ratón, y los ratones mutantes resultantes se cruzaron con ratones que expresaban cadenas ligeras kappa con una región constante humana en lugar de una de ratón. Los ratones homocigóticos para ambas inserciones producen anticuerpos IgG1 que llevan cadena capa humanizada.

En métodos de recombinación de acción específica para delección deliberada, se escinde una región de secuencia de ácido nucleico flanqueada por dos secuencias de recombinación de acción específica; la región escindida puede reemplazarse con secuencias exógenas; por ejemplo, marcadores seleccionables a fin de identificar recombinantes, o genes de reemplazamiento.

Un mamífero o célula no humano(a) de la invención modificado genéticamente puede comprender uno o más marcadores seleccionables integrado(s) en el genoma.

El marcador seleccionable es preferiblemente uno o más de: un gen de resistencia a neomicina; un gen de resistencia a puromicina; un gen de higromicina o un gen de timidina-quinasa del virus herpes simplex. Pueden utilizarse dos o más marcadores seleccionables.

Se describen también, por tanto, un mamífero no humano o una célula de mamífero no humano, preferiblemente una célula de roedor, más preferiblemente una célula de ratón, muy preferiblemente una célula del tallo embrionario de ratón, exenta del péptido MASP-2 endógeno y que comprende uno o más genes que codifican un marcador seleccionable.

5 Un mamífero no humano modificado genéticamente como se describe puede ser roedor, murino, ovino, porcino, equino, canino, felino o análogos, pero preferiblemente es un roedor, más preferente murino, y muy preferiblemente un ratón. Una célula de mamífero no humana modificada genéticamente como se describe puede ser una célula del tallo embrionario o un oocito; y es preferiblemente una célula de roedor, murino, 10 ovino, porcino, equino, canino o felino, o análoga, preferiblemente una célula de roedor, más preferiblemente una célula murina, muy preferiblemente una célula de ratón. Los ratones son particularmente preferidos dado que son fáciles de manipular y criar.

Se describe en esta memoria un ratón en el cual el gen MASP-2 endógeno está ausente, o parcialmente ausente en tal proporción que el gen no es funcional. Por parcialmente ausente se entiende que la secuencia del gen MASP-2 endógena ha sido delecionada o desorganizada en tal grado que no se codifica cantidad alguna del producto del gen MASP-2 endógeno funcional en el locus MASP-2, es decir que no podría 15 expresarse cantidad alguna del producto del gen MASP-2 endógeno funcional a partir del locus.

Se describe adicionalmente una célula del tallo embrionario (ES) de mamífero no humano caracterizada por que el gen MASP-2 endógeno está ausente o parcialmente ausente.

20 El mamífero no humano modificado genéticamente, preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón, puede reproducirse con un mamífero no humano compatible que es capaz de expresar uno o más genes MASP-2 funcionalmente activos, preferiblemente uno o más genes MASP-2 humanos funcionalmente activos, v.g. un ratón mutante por deleción puede reproducirse con un ratón capaz de expresar uno o más genes MASP-2 humanos funcionalmente activos. La progenie heterocigótica (F1) de este cruce puede someterse a 25 entrecruzamiento a fin de producir progenie heterocigótica y homocigótica (F2) de un mamífero no humano, preferiblemente un ratón, que no es capaz de expresar el gen MASP-2 endógeno y en lugar de ello es capaz de expresar sólo un gen MASP-2 extraño, preferiblemente humano.

Se describe también un mamífero no humano modificado genéticamente derivado de un mamífero no humano modificado genéticamente como se describe en esta memoria, o de una célula no humana modificada genéticamente como se describe en esta memoria, y proporciona una célula no humana modificada genéticamente derivada de un mamífero no humano modificado genéticamente como se describe en esta 30 memoria.

Se describe también un método para producir una célula no humana modificada genéticamente que comprende: transfectar una célula no humana con un constructo de direccionamiento para integración en lugar del gen MASP-2 endógeno, comprendiendo dicho constructo de direccionamiento una secuencia de 35 recombinación de direccionamiento y un marcador seleccionable; y seleccionar una célula en la cual está presente el marcador seleccionable.

Se prefiere que la célula no humana modificada genéticamente sea una célula del tallo embrionario o un oocito. La célula no humana modificada genéticamente puede ser una célula de roedor, más preferiblemente una célula de ratón.

40 Puede utilizarse cualquier vector de clonación adecuado para generar el constructo de direccionamiento, describiéndose estrategias de clonación por Sambrook, Fritsch and Maniatis in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Deseablemente, el constructo de direccionamiento puede llevar uno o más genes marcadores; marcadores adecuados son conocidos, siendo especialmente adecuados aquéllos que permiten selección positiva. Es particularmente interesante el uso del gen para neomidn- 45 fosfotransferasa ("neo"), que confiere resistencia a G418, siendo adecuado también el gen de resistencia a puromicina ("puro") o el gen de resistencia a higromicina; se prefieren los genes de resistencia a neomidina y/o puromicina.

En el constructo de direccionamiento, aguas arriba y/o aguas abajo del gen diana, puede existir un gen que proporciona identificación de si se ha producido un cruzamiento doble homólogo (selección negativa). El gen de timidina-quinasa del virus del herpes simplex (HSV-tk) puede utilizarse como marcador de selección 50 negativa, dado que las células que producen timidina-quinasa pueden ser destruidas por Aciclovir o Ganciclovir.

Una vez que se ha preparado un constructo de direccionamiento y se han eliminado cualesquiera secuencias indeseables, el constructo puede introducirse en la célula diana, por ejemplo una célula ES o un oocito. Puede emplearse cualquier técnica conveniente para introducir el DNA en la célula diana. Para direccionamiento 55 convencional de genes (usualmente constructos de hasta 20 kb), el DNA se introduce en la mayor parte de los

casos por electroporación (véase Zou et al., Eur. J. Immunol., 25, 2154-62, 1995), mientras que para modificaciones secundarias, tales como integración mediada por Cre-loxP, puede utilizarse electroporación para la integración de constructos más pequeños y otros métodos tales como lipofección y fusión esferoplasto de levadura/célula para YACs (cromosomas artificiales de levadura) y transferencia de DNA mediada por fosfato de calcio para fragmentos de cromosomas o cromosomas artificiales de mamífero que podría permitir la integración de varios centenares de kb hasta el campo de Mb. Así, la electroporación es la técnica preferida para introducción de pequeños fragmentos de DNA (hasta 50 kb) en la célula diana, siendo adecuados y quizás ventajosos los otros métodos citados para la introducción de secuencias de DNA mayores (>50 kb).

Después de la transformación o transfección de las células diana, las mismas pueden seleccionarse por medio de marcadores positivos y/o negativos. Como se ha indicado anteriormente, pueden utilizarse marcadores positivos tales como genes de resistencia a neomicina y/o puromicina. Aquellas células que tienen el fenotipo deseado pueden analizarse luego adicionalmente por análisis de restricción, electroforesis, análisis por transferencia Southern, PCR, o métodos análogos.

La PCR puede utilizarse también para detectar la presencia de recombinación homóloga. Pueden utilizarse iniciadores PCR que son complementarios para una secuencia dentro del constructo de direccionamiento, y complementarios para una secuencia fuera del constructo y en el locus diana. Las moléculas de DNA se obtienen en la reacción PCR únicamente cuando ambos iniciadores son capaces de fijarse a las secuencias complementarias, es decir sólo si ha tenido lugar recombinación homóloga. La demostración de los fragmentos de tamaño esperado, verificada por secuenciación, respalda la conclusión de que ha tenido lugar recombinación homóloga.

Si bien la presencia del gen marcador en el genoma indica que ha tenido lugar integración, es necesario determinar si ha tenido lugar integración homóloga. Métodos para conseguir esto se conocen en la técnica, tales como la utilización de análisis de DNA por hibridación mediante transferencia Southern a fin de establecer la localización de la integración. Por empleo de sondas tanto para la inserción como para las secuencias en las regiones 5' y 3' distantes de la región flanqueante en la que podría ocurrir la integración homóloga, puede demostrarse que se ha conseguido direccionamiento homólogo. Una ventaja es que las sondas externas adyacentes al DNA de direccionamiento y los sitios de restricción de nueva introducción, por ejemplo por un gen marcador seleccionable, pueden utilizarse para identificación de la desorganización deliberada.

Una célula del tallo embrionario como se describe en esta memoria, v.g. que puede obtenerse por el método anterior, puede utilizarse para la producción de un mamífero no humano modificado genéticamente.

Los procesos arriba descritos pueden realizarse primeramente para desactivar el locus MASP-2 en una célula del tallo embrionario, y las células pueden inyectarse luego en un blastocisto hospedador y desarrollarse en un animal quimérico. Métodos adecuados se describen, por ejemplo, en Hogan et al. (Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press NY). Se reproducen animales quiméricos para obtener hospedadores heterocigóticos. Después, por reproducción de los hospedadores heterocigóticos, se puede obtener un hospedador homocigótico.

Se describe en esta memoria un método para producir un mamífero no humano modificado genéticamente, caracterizado por que una célula del tallo embrionario como se describe en esta memoria se introduce en un blastocisto hospedador y se desarrolla en un animal quimérico.

Esto puede lograrse por un método caracterizado por:

(a) introducir una célula del tallo embrionario de mamífero no humano como se describe en esta memoria en un blastocisto de mamífero no humano compatible, y

(b) trasplantar el blastocisto obtenido en (a) en un en una madre adoptiva de mamífero no humano compatible para obtener un mamífero no humano quimérico, y opcionalmente, someter a cribado respecto al marcador o marcadores seleccionables, y/o para delección de la totalidad o esencialmente la totalidad de las secuencias del gen MASP-2 endógeno.

Un mamífero no humano quimérico producido por estos métodos puede reproducirse para obtener progenie heterocigótica. La progenie heterocigótica puede someterse a cruzamiento para obtener progenie homocigótica.

Utilizando los métodos descritos en esta memoria se puede obtener un mamífero no humano modificado genéticamente que no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por sí misma cantidad alguna de polipéptido MASP-2 endógeno.

Se describe en esta memoria un método para producción de un mamífero no humano modificado genéticamente capaz de expresar uno o más genes exógenos, caracterizado por reproducir un mamífero no humano modificado genéticamente que no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por sí misma cantidad alguna de

polipéptido MASP-2 endógeno, con un mamífero no humano compatible que codifica y es capaz de expresar uno o más genes exógenos, a fin de obtener progenie heterocigótica para el uno o más genes exógenos, y opcionalmente someter a cruzamiento la progenie heterocigótica para producir progenie homocigótica para los uno o más genes exógenos.

5 Un gen exógeno es un gen que es extraño, es decir no natural, al mamífero o célula no humano hospedador.

Así pues, el método puede utilizarse para producir un mamífero no humano, que es preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón, que es capaz de expresar uno o más genes MASP-2 extraños, preferiblemente humanos por reproducción del mamífero no humano modificado genéticamente como se define en esta memoria que es incapaz de expresar genes MASP-2 funcionalmente activos (endógenos), con un mamífero no humano compatible,  
10 precisamente un roedor, más preferiblemente un ratón, que es capaz de expresar uno o más genes MASP-2 extraños funcionalmente activos, preferiblemente humanos. Esto permite el intercambio interespecies gen/locus para producir progenie seleccionada (heterocigótica u homocigótica) con uno más genes exógenos funcionalmente activos, preferiblemente humanos de las características deseadas en un fondo en el que los genes correspondientes del mamífero no humano están silenciados o eliminados. Un mamífero no humano de este tipo puede ser útil en la  
15 producción de anticuerpos para el gen exógeno, y la presente invención proporciona adicionalmente un método para la producción de tales anticuerpos, y los anticuerpos producidos en dicho método.

Como se utiliza esta memoria, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de los mismos derivados de cualquier mamífero productor de anticuerpos (v.g., ratón, rata, conejo, y primate, con inclusión de humano) que se fija específicamente a polipéptidos MASP-2 o porciones de los mismos. Anticuerpos ilustrativos  
20 incluyen anticuerpos polidonaes, monoclonales y recombinantes, anticuerpos multiespecíficos (v.g., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos ratón-humano, ratón-primate, anticuerpos monoclonales humanos, y anticuerpos anti-idiotipo, y pueden ser una molécula intacta o un fragmento de la misma.

Como se utiliza en esta memoria, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a una porción derivada de o afín a un anticuerpo anti-MASP-2 de longitud total, que incluye generalmente la región de fijación de antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos ilustrativos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Como se utilizan esta memoria, los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Por regla general, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL, lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para fijación del antígeno.

Como se utiliza en esta memoria, un "anticuerpo quimérico" es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y las regiones determinantes de la complementariedad derivadas de un anticuerpo de especie no humana  
35 (v.g., roedor), mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se deriva de un anticuerpo humano.

Como se utiliza en esta memoria, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo quimérico que comprende una secuencia mínima que se ajusta a las regiones específicas determinantes de la complementariedad derivadas de una inmunoglobulina no humana que se trasplanta a un entramado de anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son típicamente proteínas recombinantes en las cuales únicamente las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo son de origen no humano.

Anticuerpos policlonales contra MASP-2 pueden prepararse por inmunización de un animal con el polipéptido MASP-2 o una porción inmunógena del mismo utilizando métodos bien conocidos por quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," en *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), página 105. La inmunogenicidad de un polipéptido MASP-2 puede aumentarse por el  
45 uso de un adyuvante, con inclusión de geles minerales, tales como hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund (completo o incompleto), sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles Pluronic, polianiones, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave y dinitrofenol. Los anticuerpos policlonales se generan típicamente en animales tales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, conejos, cobayos, cabras, u ovejas. Alternativamente, un anticuerpo anti-MASP-2 útil en la presente invención puede derivarse también de  
50 un primate subhumano. Técnicas generales para anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos pueden encontrarse, por ejemplo, en Goldenberg et al., *Publicación de Patente Internacional No. WO 91/11465*, y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990. Sueros que contienen anticuerpos inmunológicamente activos se producen luego a partir de la sangre de tales animales inmunizados utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

55 En algunos casos, el anticuerpo MASP-2 puede ser un anticuerpo monodonal. Los anticuerpos monoclonales anti-MASP-2 son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo epítipo de MASP-2. Como se utiliza en esta memoria, el modificador "monodonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población

sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Los anticuerpos monodonaes pueden obtenerse utilizando cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por linajes de células continuas en cultivo, tal como el método del hibridoma descrito por Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975, o pueden producirse por métodos de DNA recombinante (véase, v.g., la Patente U.S. No. 4.816.567). Pueden aislarse también anticuerpos monoclonales a partir de bibliotecas de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991, y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, con inclusión de IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas.

Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales por inyección de un mamífero adecuado (v.g., un ratón BALB/c) con una composición que comprende un polipéptido MASP-2 o porción del mismo. Después de un periodo de tiempo predeterminado, se separan los esplenocitos del ratón y se suspenden en un medio de cultivo de células. Los esplenocitos se fusionan luego con un linaje de células inmortales para formar un hibridoma. Los hibridomas formados se dejan crecer en cultivo de células y se someten a cribado respecto a su capacidad para producir un anticuerpo monoclonal contra MASP-2.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos por el uso de ratones transgénicos que se han modificado por ingeniería para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a enfrentamiento antigénico. En esta técnica, elementos del locus de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana se introducen en variedades de ratones derivadas de linajes de células del tallo embrionario que contienen desorganizaciones deliberadas de los loci de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, tales como los antígenos MASP-2 descritos en esta memoria, y los ratones pueden utilizarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos MASP-2 por fusión de células B de tales animales con linajes de células de mieloma adecuadas utilizando tecnología convencional de Kohler-Milstein. Ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulinas humanas están disponibles comercialmente (e.g., de Abgenix, Inc., Fremont, CA, y Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Métodos para obtención de anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Los anticuerpos monodonaes pueden aislarse y purificarse a partir de cultivos de hibridoma por una diversidad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A Sepharose, cromatografía de exclusión de tamaños, y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en *Methods in Molecular Biology*, vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc., 1992).

Anticuerpos monodonaes útiles en el método de esta invención incluyen anticuerpos quiméricos en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos (Patente U.S. No. 4,816,567 y Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci., USA* 81:6851-6855, 1984). Una forma de un anticuerpo quimérico útil en el método es un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MASP-2. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (v.g., murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Anticuerpos monoclonales humanizados se producen por transferencia de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas (verbigracia, de ratón), de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Típicamente, los residuos de anticuerpos humanos se sustituyen luego en las regiones de entramado de las contrapartidas no humanas. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente la eficiencia del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones de entramado Fv son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Reichman et al., *Nature* 332:323-329, 1988, y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992.

Técnicas para producción de anticuerpos monoclonales humanizados se describen también, por ejemplo, por Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; Singer et al., *J. Immun.* 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols* (Humana Press, Inc., 1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," en *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc., 1996); y por Queen et al., Patente U.S. No. 5,693,762 (1997). Adicionalmente, existen entidades comerciales que sintetizarán

anticuerpos humanizados a partir de regiones específicas de anticuerpo murino, tales como Protein Design Labs (Mountain View, CA).

La presente descripción se extiende adicionalmente no sólo a moléculas de inmunoglobulina intactas sino también a los fragmentos bien conocidos que inducen Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2 y Fv, fragmentos scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Es bien conocido en la técnica que sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratope, está implicada en la fijación del anticuerpo a su epítipo (véase, v.g., Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo son efectores de la vía clásica del complemento, pero no están implicadas en la fijación de antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', se conoce como un fragmento F(ab')2 y retiene los dos sitios de fijación de antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento F(ab')2 aislado se conoce como un fragmento monodonal bivalente debido a sus dos sitios de fijación de antígeno. Análogamente, un fragmento del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, se designa como fragmento Fab, y retiene uno de los sitios de fijación de antígeno de una molécula de anticuerpo intacta.

Fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por hidrólisis proteolítica, tal como por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S designado

F(ab')2. Este fragmento puede escindirse ulteriormente utilizando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5 S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse utilizando un grupo bloqueante de los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática utilizando pepsina produce directamente dos fragmentos monovalentes Fab y un fragmento Fc. Estos métodos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patente U.S. No. 4,331,647; Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., en *Methods in Enzymology*, 1:422 (Academic Press 1967); y por Coligan en las páginas 2.8.1 - 2.8.10 y 2.10. - 2.10.4.

En algunos casos, se prefiere el uso de fragmentos de anticuerpo que carecen de la región Fc para evitar la activación de la vía clásica del complemento que se inicia después de fijación de Fc al receptor Fcγ. Existen varios métodos por los cuales puede producirse un MAb que evita las interacciones con el receptor Fcγ. Por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo monoclonal puede eliminarse químicamente utilizando digestión parcial por enzimas proteolíticas (tal como digestión con ficina), generando con ello, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de fijación de antígeno tales como fragmentos Fab o F(ab)2 (Mariani, M et al., *Mol. Immunol.* 28:69-71, 1991). Alternativamente, el isotipo de IgG humana γ4, que no se fija a los receptores Fcγ, puede utilizarse durante la construcción de un anticuerpo humanizado como se describe en esta memoria. Los anticuerpos, anticuerpos monocatenarios y dominios de fijación de antígeno que carecen del dominio Fc pueden modificarse también por ingeniería genética utilizando técnicas recombinantes descritas en esta memoria.

Alternativamente, pueden crearse moléculas simples de fijación de cadena peptídica específicas para MASP-2 en las cuales las regiones Fv de las cadenas pesada y ligera están conectadas. Los fragmentos Fv pueden estar conectados por un enlazador peptídico para formar una proteína fijadora de antígeno monocatenaria (scFv). Estas proteínas monocatenarias fijadoras de antígeno se preparan por construcción de un gen estructural que comprende secuencias de DNA que codifican los dominios VH y VL que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce subsiguientemente en una célula hospedadora, tal como E. Coli. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido simple con un péptido enlazador que puentea los dos dominios V. Métodos para producir scFvs se describen, por ejemplo, por Whitlow et al., "*Methods: A Companion to Methods in Enzymology*" 2:97, 1991; Bird et al., *Science* 242:423, 1988; Ladner et al., Patente U.S. No. 4,946,778; y Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271; 1993.

Se proporciona un método para producir un mamífero o célula no humano(a) modificado(a) genéticamente capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende la introducción de uno o más genes exógenos en una célula de mamífero no humano como se describe en esta memoria que no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por sí misma cantidad alguna de polipéptido MASP-2 endógeno. Se prefiere que la célula de mamífero no humano sea una célula del tallo embrionario o un oocito. Cuando la célula de mamífero no humano es una célula ES, se prefiere que los uno o más genes exógenos se introduzcan por transfección. Cuando la célula de mamífero no humano es un oocito (célula huevo) se prefiere que los uno o más genes exógenos se introduzcan por microinyección de DNA. Preferiblemente, los uno o más genes exógenos se insertan en el genoma del mamífero o célula no humano(a), y muy preferiblemente los uno o más genes exógenos se insertan en una secuencia de recombinación de acción específica no endógena.

Se describe también un mamífero o célula no humano(a) capaz de expresar uno o más genes exógenos, que puede obtenerse por un método descrito en esta memoria y que proporciona el uso de un mamífero o célula no humano(a) en la producción de MASP-2 exógeno, preferiblemente MASP-2 humano.

5 Se describe también en esta memoria un mamífero no humano modificado genéticamente o una célula de mamífero no humano modificada genéticamente, caracterizado(a) por que no comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por sí misma un polipéptido MAp 19 endógeno. Un mamífero de esta clase puede ser útil para los mismos o similares propósitos, y de manera igual o similar a los mamíferos no humanos modificados genéticamente deficientes en MASP-2 descrito anteriormente. Por tanto, a no ser que se especifique otra cosa, la persona experta comprenderá que las afirmaciones anteriores relativas a mamíferos deficientes en MASP-2, y a anticuerpos y otros productos que pueden obtenerse a partir de tales mamíferos, y a métodos que implican tales mamíferos, son igualmente aplicables a mamíferos deficientes en MAp 19.

Se describe adicionalmente en esta memoria un mamífero no humano modificado genéticamente o una célula de mamífero no humano modificada genéticamente, caracterizado(a) por que carece de una respuesta de la vía de lectina del complemento.

15 Un mamífero no humano modificado genéticamente de la invención es un roedor, preferiblemente murino, y muy preferiblemente un ratón. Una célula de mamífero no humano modificada genéticamente como se describe puede ser una célula del tallo embrionario o un oocito; y es una célula de roedor, más preferiblemente una célula de murino, y muy preferiblemente una célula de ratón. Se prefieren particularmente los ratones, dado que son fáciles de manipular y criar.

20 Se describe en esta memoria un ratón en el cual no está presente respuesta funcional alguna de la vía de lectina del complemento.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La Figura 1 muestra un mapa que indica el direccionamiento de MASP-2 murino para experimentos de desactivación, junto con un constructo utilizado para desactivación de MASP-2, según una realización de la presente invención.

La Figura 2 muestra un constructo loxP útil para direccionamiento de MAp19 (como exón 5 del MASP-2 murino) para experimentos de desactivación, según una realización de la presente invención, útil en la generación de un mamífero deficiente en MAp19 /suficiente en MASP-2.

30 La Figura 3 muestra un constructo alternativo útil para direccionamiento de MAp19 para experimentos de desactivación, útil en la generación de un mamífero deficiente en MAp19 y MASP-2.

La Figura 4 muestra constructos de minigén (A) MASP-2 humano y (B) MAp19 humano utilizados para generación de animales transgénicos.

La Figura 5 muestra los resultados de experimentos que indican que los ratones deficientes en MASP-2 carecen de la activación de C4 mediada por la vía de lectina.

35 La Figura 6 muestra los resultados de experimentos que indican que los ratones deficientes en MASP-2 carecen de la activación de C3 mediada por la vía de lectina.

La Figura 7 muestra los resultados de experimentos que indican que los ratones deficientes en MAp19 carecen de la activación de C4 mediada por la vía de lectina.

40 La Figura 8 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de MBL en pacientes que tienen lesiones isquémicas de reperfusión.

La Figura 9 es un diagrama de flujo que resume los resultados extraídos de los experimentos con ratones deficientes en MASP-2 y MAp19 descritos en las Figuras 5,6 y7.

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 1) del constructo de minigén MASP-2 de la Figura 4A.

45 La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 2) del constructo de minigén MAp19 de la Figura 4B.

La Figura 12 se muestra los resultados de un experimento que indica que la proteína MASP-2 recombinante reconstituye la activación de C4 mediada por la vía de lectina en ratones deficientes en MASP-2.

50 La Figura 13 muestra los resultados de un experimento que indica que la vía clásica es funcional en los ratones deficientes en MASP-2.

### Descripción detallada de los dibujos

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran mapas que indican el direccionamiento de las desactivaciones de MASP-2 y MAp19 de ratón, y muestran constructos utilizados en el direccionamiento. La Figura 4 muestra constructos de minigén utilizados para introducción de los genes humanos MASP-2 y MAp19 en ratones desactivados genéticamente. La secuencia de mRNA de MASP-2 de ratón está disponible bajo el número de acceso a GenBank BC013893.

Los presentes inventores han generado 5 variedades de ratón diferentes por direccionamiento de genes y/o tecnología de transgenes. Estos linajes están diseñados de modo que sean selectivamente suficientes para los productos MASP-2 del gen MASP2 murino (es decir la serina-proteasa (PM 74.095 Da) de la vía del complemento de lectina) y/o MAp19 (denominado también sMAP) (es decir el producto del gen MASP2 alternativo de PM 19075 Da asociado con los complejos de iniciación de la vía de lectina). Se describen tres linajes con deficiencias de productos del gen MASP-2 murinos: un linaje deficiente en la serina-proteasa MASP-2, pero suficiente en MAp19/sMAP (constructo representado en la Figura 1), un linaje deficiente en MAp19/sMAP (constructo representado en la Figura 2), y un linaje deficiente tanto en MASP-2 como en MAp19/sMAP (constructo representado en la Figura 3).

La confirmación de las deficiencias se realizó por detección de transcritos de mRNA y/o experimentos de transferencia Western. La detección del ácido nucleico se determinó por RT-PCR resuelta en tiempo utilizando un instrumento LightCycler, mientras que los descubrimientos se confirmaron por transferencia Western.

Se establecieron adicionalmente dos constructos de minigén humanos (véase la Figura 4) que expresaban MASP-2 humano o MAp19 humano en los ratones desactivados genéticamente.

Haciendo referencia por ahora a MASP-2, el constructo de la Figura 1 se estableció en el vector de direccionamiento de genes pKO-NTKV 1901 (Stratagene, CA) y se utilizó para transfectar el linaje de células ES de murino E14.1a (fondo genético SV129 Ola). Las células transfectadas que integraban el constructo en su DNA cromosómico se seleccionaron por resistencia a neomicina y el evento de recombinación se seleccionó por pérdida de la actividad de timidina-quinasa (TK) mediada por el gen TK contenido en pKO-NTKV. De 600 clones de células ES después de la transfección, la integración simple del constructo de direccionamiento del gen y el elemento de direccionamiento dentro del gen MASP2 murino se comprobaron por análisis de transferencia Southern utilizando sondas de hibridación específicas para la casete de neomicina contenida en el constructo de direccionamiento y una sonda específica para el gen MASP2 murino localizado fuera del concepto de direccionamiento. Se identificaron 4 clones de células diferentes en los cuales ocurría un evento de direccionamiento y recombinación selectivo y se utilizaron éstos para crear quimeras por tecnología de transferencia de embrión en la Unidad Transgénica de la Universidad de Leicester. Las quimeras se sometieron a retrocruzamiento en el fondo genético C57/BL6 y se crearon machos transgénicos que transmitían el gen desorganizado en su línea germinal. El apareamiento de tales ratones "transmisores de la línea germinal" con hembras (fondo genético C57/BL6) generó un F1, un 50% de cuya descendencia exhibía heterocigosidad para el gen MASP2 desorganizado. Estos ratones heterocigóticos se cruzaron, generando ratones descendientes homocigóticos deficientes en MASP2, heterocigóticos y de tipo salvaje en la ratio 1:2:1, respectivamente.

El primer linaje de ratones deficientes en MASP-2 (denominados de ahora en adelante MASP2  $-/-$  CS) se estableció utilizando el constructo de direccionamiento descrito en la Figura 1. La estrategia seleccionada desorganiza 3 exones (exones 10, 11, y 12) que codifican el extremo C-terminal de MASP-2, incluyendo el exón que codifica el dominio de serina-proteasa, pero la desorganización está muy distante de los exones que codifican el otro producto del gen MASP2, MAp19/sMAP.

La variedad de murino resultante, MASP2  $-/-$  CS generada con el constructo de desorganización descrito en la Figura 1 es fértil y viable y contiene una deficiencia deliberada para MASP-2 cuando es homocigótica para el alelo desorganizado. MAp19/sMAP, el producto génico alternativo del gen MASP2, está presente tanto al nivel de mRNA como al nivel de proteína (determinado por RT-PCR y transferencia Western). Estos ratones expresan las otras dos serina-proteasas asociadas con la vía de lectina, es decir MASP-1 y MASP-3.

Como se muestra en la Figura 5, el plasma de los ratones MASP2  $-/-$  CS es totalmente deficiente en lo que respecta a la activación del complemento mediada por la vía de lectina en placas recubiertas de manano (Fig. 5A) y zimosán (Fig. 5b), como se muestra en el ensayo de escisión de C4 específico de la vía de lectina. Esto demuestra claramente que MASP-2, pero no MASP-1 o MASP-3, es el componente efector de la vía de lectina de activación del complemento. MASP-1 y MASP-3 no pueden compensar la pérdida de actividad funcional de MASP-2 para mantener la actividad residual de la vía de lectina en condiciones fisiológicas. Este resultado y las observaciones previamente descritas del equipo de investigación del profesor Teizo Fujita (que generaron una variedad de murino direccionada genéticamente deficiente en MASP-1 y MASP-3 sin deficiencia alguna en la activación del complemento mediada por la vía de lectina) demuestra que MASP-1 y MASP-3 están sólo - en todo caso - marginalmente implicados en la activación del sistema del complemento.

Otro hallazgo fundamental logrado por análisis del plasma de ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS se muestra en la Figura 6. Se analizaron ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS respecto a la presencia de los factores C3, B, D y properdina del complemento que - con arreglo al conocimiento del libro de texto presente - deberían formar una tercera vía funcionalmente activa de activación del complemento, es decir la vía alternativa que escindiría C3 con independencia de las otras dos vías sobre superficies de activación como zimosán. Como se muestra en la Figura 6, en plasma deficiente en MASP-2, no ocurre activación alguna de C3 o sólo una activación marginal en placas recubiertas de manano (Fig. 6A) y de zimosán (Fig. 6B), como se muestra por deposición de C3b. Esto demuestra claramente que se requiere MASP-2 para ayudar a que el C3b inicial inicie la vía alternativa. En ausencia de MASP-2, no es proporcionada cantidad alguna de C3b inicial por la vía de lectina e incluso sobre zimosán, una superficie activadora establecida de activación de la vía alternativa, no puede observarse escisión alguna de C3 mediada por la vía alternativa. La actividad de escisión marginal observada a concentraciones elevadas de suero deficiente en MASP-2 podría ser resultado de una actividad residual de la vía clásica en las condiciones experimentales utilizadas.

Los ensayos de escisión de C3 y C4 utilizados en la obtención de los datos que se muestran en las Figuras 5 a 7 se describen en Lynch, N.J.; Roscher, S.; Hartung, T., Morath, S.; Matsushita, M.; Maennel, D.N.; Kuraya, M.; Fujita, T.; Schwaeble W.J. L-ficolin Specifically Binds to Lipoteichoic Acid, a Cell Wall Constituent of Gram-positive Bacteria, and Activates the Lectin Pathway of Complement. *J. Immunol.* 172: 1198-1202 (2004); y Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods.* 257: 107-116 (2001).

Con objeto de establecer que la ausencia de MASP-2 era la causa directa de la pérdida de activación de C4 dependiente de la vía de lectina en los ratones MASP-2 <sup>-/-</sup> CS, se examinó el efecto de la adición de proteína MASP-2 recombinante a muestras de suero en el ensayo de escisión de C4. Se generaron proteínas recombinantes MASP-2 murinas funcionalmente activas y MASP-2A murinas catalíticamente inactivas (en las cuales el residuo serina del sitio activo en el dominio de serina-proteasa estaba sustituido por un residuo alanina) como se describe en *J. Endotoxin Res.* 11(1): 47-50 (2005). El suero acumulado de 4 ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS se preincubó con concentraciones crecientes de proteína de MASP-2 murina recombinante o MASP2A murina recombinante inactiva y se ensayó la actividad de convertasa C4 como se ha descrito arriba. Como se muestra en la Figura 12, la adición de proteína MASP-2 recombinante murina funcionalmente activa (representada con triángulos vacíos) al suero obtenido de los ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS restablecía la activación de C4 dependiente la vía de lectina de una manera dependiente de la concentración de proteína, mientras que la proteína MASP-2A murina catalíticamente inactiva (representada como asteriscos) no restablecía la activación de C4. Los resultados presentados en la Figura 12 están normalizados respecto a la activación de C4 observada con suero acumulado de ratones normales (representado como una línea de trazos).

La Figura 13 demuestra que la vía clásica es funcional en los ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS. En este experimento, muestras de suero sin tratar y empobrecido el C1q obtenidas de ratones de tipo salvaje y ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS se añadieron en cada caso a placas recubiertas con complejos inmunes (generados *in situ* por adición de BSA y adición subsiguiente de anti-BSA de conejo). El C3b fijado se detectó con un anticuerpo anti-C3c. Como se muestra en la Figura 13, la deposición de C3b era dependiente de C1q tanto en los ratones de tipo salvaje (el suero de tipo salvaje empobrecido en C1q se representa como círculos vacíos) como en los ratones MASP2 <sup>-/-</sup> CS (el suero de MASP2 <sup>-/-</sup> CS empobrecido en C1q se representa como triángulos vacíos). El suero de control de tipo salvaje (representado como cruces) y el suero de MASP2 <sup>-/-</sup> CS (representado como triángulos llenos) respaldan ambos la activación de C3 como se muestra por la deposición de C3b.

La segunda variedad murina direccionada al gen MASP2 se estableció utilizando el constructo de desorganización de genes descrito en la Figura 2. Con objeto de generar una variedad murina deficiente en MASP2, pero suficiente en MASP-2, el exón 5, que es el exón responsable de la generación de la transcripción de mRNA específico de MASP2 se reemplazó por una casete de neomicina, flanqueada por sitios loxP. Se utilizó el constructo de direccionamiento de genes para transfectar un linaje de células del tallo embrionario derivado de la variedad de ratón BALB/c. Después de selección por resistencia a neomicina, a fin de identificar transformantes, se utiliza el sistema Cre/loxP para escindir el gen marcador entre las secuencias loxP del constructo. Esto da como resultado un ratón que carece del exón 5 de MASP-2, y sin un gen marcador que desorganice los exones restantes. El ratón está diseñado así para ser deficiente en MASP2 (dado que está ausente el exón 5), pero se espera que sea suficiente respecto a MASP-2 (dado que los exones restantes están presentes y el gen no está desorganizado). Los inventores han observado, sin embargo, que la expresión de proteínas de MASP-2 es reducida en los ratones deficientes en MASP2, como se determina por transferencia Western (datos no presentados). La variedad murina deficiente en MASP2 generada cuando es homocigótica para el alelo desorganizado es fértil y viable, y se designará de ahora en adelante como MASP2 <sup>-/-</sup> TF.

La Figura 7 muestra los resultados de un experimento que indica que el ratón MASP2 <sup>-/-</sup> TF es deficiente en la activación del complemento mediada por la vía de lectina en placas recubiertas de manano. En este experimento se utilizó el mismo ensayo empleado para la Figura 5.

La tercera variedad de murino direccionada por el gen MASP2 se estableció utilizando el constructo de desorganización de genes descrito en la Figura 3, de igual manera que se ha descrito arriba para el ratón deficiente en MASP-2. Para generar una variedad de murino deficiente en M $\alpha$ p19/sMAP y MASP-2, el exón 5, que es el exón responsable de la generación del transcrito de mRNA específico de M $\alpha$ p19/sMAP del gen MASP2 se reemplazó por una casete de neomicina. A diferencia del constructo descrito con referencia a la Figura 2, el constructo de la Figura 3 no induce secuencias loxP. Por tanto, el gen marcador utilizado no puede escindirse, por lo que la variedad de ratón resultante carece del exón 5 de MASP-2, pero los exones de MASP-2 restantes están desorganizados por la presencia del gen marcador. El ratón resultante es por consiguiente deficiente tanto en M $\alpha$ p19 como en MASP-2. El linaje de murino direccionado por el gen creado utilizando este constructo se denominará de ahora en adelante MASP-2/M $\alpha$ p19<sup>-/-</sup>.

Con objeto de reemplazar el MASP-2 murino deficiente y/o el M $\alpha$ p19 murino deficiente con MASP-2 humano o M $\alpha$ p19 humano, se establecieron dos constructos de minigén como se describe en la Figura 4. La Figura 4a describe el constructo de minigén que codifica MASP-2 humano que utiliza la región promotora del gen MASP-2 humano, incluyendo los 3 primeros exones (exón 1 a exón 3) seguidos por la secuencia de cDNA que representa la secuencia codificante de los 8 exones siguientes, codificando por tanto la longitud total de la serina-proteasa de MASP-2. Este constructo de minigén, denominado mini hMASP-2 se inyectó en huevos fertilizados de MASP-2<sup>-/-</sup>CS a fin de reemplazar el gen MASP-2 murino deficiente por MASP-2 humano expresado transgénicamente. La secuencia del constructo de minigén MASP-2 (SEQ ID NO 1) se da en la Figura 10.

La Figura 4B describe el constructo de minigén que codifica M $\alpha$ p19/sMAP humano que utiliza la región promotora del gen MASP-2 humano, con inclusión de los 3 primeros exones (exón 1 a exón 3) seguido por la secuencia de cDNA que representa la secuencia codificante de los dos exones siguientes, codificando por tanto la longitud total de M $\alpha$ p19. Este constructo de minigén, denominado mini hM $\alpha$ p19, se inyectó en huevos fertilizados de MASP-2<sup>-/-</sup>CS a fin de reemplazar M $\alpha$ p19 murino deficiente por M $\alpha$ p19 humano expresado transgénicamente. La secuencia del constructo M $\alpha$ p19 (SEQ ID NO 2) se da en la Figura 11.

La primera parte de la secuencia dada en ambas Figuras 10 y 11 representa el promotor de MASP-2 humano y los tres primeros exones, y es idéntica en ambos constructos. La segunda parte de cada secuencia representa la secuencia codificante de cDNA de los 8 exones siguientes (Figura 10) o los dos exones siguientes (Figura 11). La secuencia peptídica relevante se da también en la Figura 11, en tanto que la parte codificante de la Figura 10 se muestra en mayúsculas.

Un ratón desactivado MASP2<sup>-/-</sup> que expresa MASP2 humano para uso como modelo para someter a cribado con respecto a agentes inhibidores de MASP-2 puede producirse como sigue. Un ratón MASP2<sup>-/-</sup> como se ha descrito arriba y un ratón MASP2<sup>-/-</sup> que expresa un constructo transgénico de MASP2 humano (MASP2 humano desbloqueado) como se describe arriba se cruzan, y la progenie que son MASP-2<sup>-/-</sup> murino, M $\alpha$ p19<sup>+</sup> murino, y MASP-2<sup>+</sup> humano se utilizan para identificar agentes inhibidores de MASP-2 humano.

Tales modelos animales pueden utilizarse como sustratos de test para la identificación y eficacia de agentes inhibidores de MASP-2 tales como anticuerpos anti-MASP-2 humanos, péptidos y sustancias no peptídicas inhibidoras de MASP-2, y composiciones que comprenden agentes inhibidores de MASP-2. Por ejemplo, el modelo animal se expone a un compuesto o agente que se sabe desencadena la activación del complemento dependiente de MASP-2, y se administra al modelo animal un agente inhibidor de MASP-2 durante un tiempo y a una concentración suficientes para provocar una reducción de los síntomas de enfermedad en el animal expuesto.

Adicionalmente, pueden utilizarse ratones MASP-2<sup>-/-</sup>, M $\alpha$ p19<sup>+</sup> murino, y MASP-2<sup>+</sup> humano para generar linajes de células que contienen uno o más tipos de células implicados en una enfermedad asociada a MASP-2 que pueden utilizarse como modelo de cultivo de células para dicho trastorno. La generación de linajes de células continuas a partir de animales transgénicos es bien conocida en la técnica, por ejemplo, véase Small, et al., Mol. Cell Biol., 5: 642-48 (1985).

Los resultados de un experimento que demuestra que el sistema de activación del complemento de MASP-2 dependiente de lectina se activa en la fase de reperfusión después de reparación de un aneurisma aórtico abdominal se presentan en la Figura 8. Éste es un gráfico que ilustra el cambio en los niveles de MBL en pacientes que tienen lesiones isquémicas de reperfusión. Pacientes que sufren reparación de aneurisma aórtico abdominal (AAA) se someten a lesión isquémica de reperfusión, que está mediada en gran parte por activación del complemento. Los inventores investigaron el papel de la vía de lectina del complemento en la lesión isquemia-reperfusión en pacientes que se sometieron a reparación AAA.

Los pacientes a reparación AAA infrarrenal electiva se sometieron a extracción de muestras de sangre sistémica tomada de su arteria radial (por una vía arterial) en cuatro momentos definidos durante el procedimiento (momento 1: inducción de la anestesia, momento 2: inmediatamente antes del pinzamiento aórtico, momento 3: inmediatamente antes de la retirada del pinzamiento aórtico y momento 4: durante la reperfusión). Se utilizaron como controles pacientes sometidos a cirugía abdominal mayor, que se sometieron

a extracción de muestras de sangre en el momento de la inducción y dos horas después de la iniciación del procedimiento. El plasma de los pacientes se ensayó respecto a niveles de lectina fijadora de manano (MBL) utilizando técnicas ELISA. MBL es una molécula de reconocimiento del patrón de plasma que inicia la activación de la vía de lectina por activación de la serina-proteasa MASP-2 asociada a MBL. Los inventores han utilizado el consumo de MBL plasmática como parámetro para la activación de la vía de lectina que ocurre durante la reperfusión.

Los resultados se ilustran en la Figura 8. Se seleccionaron 23 pacientes que sufrían reparación de AAA y 8 pacientes de control. Mientras que se observó sólo un pequeño consumo de MBL en las muestras de plasma tomadas del grupo de control sometido a cirugía abdominal mayor, los pacientes AAA exhiben una disminución importante en los niveles plasmáticos de MBL - que alcanza como promedio aproximadamente 41%.

Los datos presentados proporcionan una indicación sólida de que la vía de lectina de sistema del complemento se activa en la fase de reperfusión después de la reparación AAA. Esto parece ser secundario a la lesión isquemia-reperfusión, dado que los sueros de control de los pacientes sometidos a cirugía abdominal mayor sin una lesión isquemia-reperfusión importante exhiben sólo una ligera disminución en los niveles plasmáticos de MBL. A la vista de la contribución bien establecida de la activación del complemento en la lesión de reperfusión, los inventores llegan a la conclusión de que la activación de la vía de lectina en las células endoteliales isquémicas es un factor importante en la patología de la lesión de reperfusión, y que un bloqueo transitorio específico de la actividad de la vía de lectina podría tener un impacto terapéutico importante en el de la enfermedad en procedimientos que implican una agresión isquémica transitoria, a saber infarto de miocardio, infarto intestinal, quemaduras, trasplantes y derrame cerebral. Estos resultados confirman también que los organismos deficientes en la vía de lectina podrían ser muy útiles como organismos modelo para el estudio de la vía, o para el desarrollo de tratamientos de lesiones isquémicas.

Por último, la Figura 9 es un diagrama de flujo que resume las vías relevantes de lectina basado en la información obtenida de los experimentos descritos en esta memoria. Los autores de la presente invención han identificado que MASP2 es necesario para iniciar la activación de la vía alternativa del complemento. Por el uso de un modelo de ratón desactivado de MASP2 *-/-*, los presentes inventores han demostrado que es posible inhibir la deposición de C3b, el paso de iniciación en la activación de la vía alternativa del complemento por la vía de MASP-2 dependiente de lectina, en tanto que se deja intacta la vía clásica, estableciendo con ello la activación de MASP2 dependiente de lectina como requerimiento para la activación alternativa del complemento en ausencia de implicación de la vía clásica. Por ello, se sugiere el uso de MASP-2 como diana terapéutica para inhibición de la lesión celular asociada con la activación de la vía alternativa del complemento mediada por lectina, en tanto que se deja intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario.

Además, habiéndose establecido ahora la activación del complemento mediada por MASP-2 por la vía de lectina, como requerimiento para la iniciación de la vía de activación alternativa en ausencia de implicación de la vía clásica, los inventores han extendido adicionalmente los presentes descubrimientos en el sentido de que MAp19 puede tener un papel biológico en la regulación de la expresión de la proteína MASP-2 y la ruta de activación de la vía de lectina del complemento. Por el uso de un modelo de ratón direccionado genéticamente para la deficiencia de MAp19 (es decir, MAp19*-/-*), los presentes inventores han demostrado que es posible inhibir la activación de la vía de lectina y la deposición de C4 por la vía de la lectina dependiente de MASP-2, en tanto que se deja intacta la vía clásica. Así, se sugiere el uso de MAp19 como diana terapéutica para inhibición de la lesión celular asociada con la activación de la vía alternativa del complemento mediado por lectina, en tanto que se deja intacto el componente de la vía clásica (dependiente de C1q) del sistema inmunitario.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente, caracterizado por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y/o el gen que codifica el polipéptido MAp19 endógeno está(n) ausente(s) o parcialmente ausente(s) o desorganizados de tal modo que no se produce el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor y/o MAp19 endógeno de roedor.
2. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente según la reivindicación 1, caracterizado por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 está desorganizado del genoma de tal modo que no se produce el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor.
- 10 3. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que (i) el mismo puede obtenerse o se obtiene por delección deliberada de prácticamente todas las secuencias endógenas del gen MASP-2 y/o MAp19 y/o (ii) están presentes en el genoma uno o más marcadores seleccionables, en donde el o los marcadores seleccionables es/son uno o más marcadores seleccionables seleccionados de un grupo que comprende un gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a puromicina, y un gen de resistencia a higromicina.
- 15 4. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que es un ratón o célula de ratón.
5. Una célula de roedor modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la célula de roedor es una célula del tallo embrionario.
- 20 6. Un roedor modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, derivado de un roedor modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un roedor modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, derivado de una célula de roedor modificada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Una célula de roedor modificada genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 derivada de un roedor modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 9. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente, caracterizado por que los exones 10, 11 y 12 del gen MASP-2 endógeno están delecionados del genoma.
- 30 10. Un método para producir una célula de roedor modificada genéticamente que comprende: transfectar una célula de roedor con un constructo de direccionamiento para integración aguas arriba de, o dentro del gen MASP-2 o MAp19, comprendiendo dicho constructo de direccionamiento una secuencia de recombinación de direccionamiento y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la cual está presente el marcador seleccionable y someter a cribado dicha célula respecto a integración de la secuencia de recombinación, en donde dicha célula modificada genéticamente se caracteriza por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y/o el gen que codifica el polipéptido MAp19 endógeno está/están ausentes o parcialmente ausentes o desorganizados de tal modo que el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor y/o MAp19 endógeno de roedor no se produce.
- 35 11. Un método según la reivindicación 10, caracterizado por que (i) la célula de roedor modificada genéticamente es una célula de ratón y/o (ii) la célula de roedor modificada genéticamente es una célula del tallo embrionario.
- 40 12. El uso de una célula del tallo embrionario de la reivindicación 5, o una célula que puede obtenerse por un método de cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, para la producción de un roedor modificado genéticamente según la reivindicación 1.
- 45 13. Un método para producir un roedor modificado genéticamente capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende reproducir un roedor modificado genéticamente, caracterizado por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y/o el gen que codifica el polipéptido MAp19 endógeno está/están ausente(s) o parcialmente ausente(s) o desorganizado(s) de tal modo que el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor y/o el polipéptido MAp19 endógeno de roedor no se produce(n), con un roedor compatible que codifica y es capaz de expresar uno o más genes exógenos, para obtener progenie heterocigótica para el uno o más genes exógenos, y cruzar opcionalmente la progenie heterocigótica para producir progenie homocigótica respecto al uno o más genes exógenos.
- 50 14. Un método para producir un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende introducir uno o más genes exógenos en la célula de roedor, caracterizado por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y/o el gen que codifica el

polipéptido endógeno MAp19 está/están ausentes o parcialmente ausentes o desorganizados según las reivindicaciones 1 a 5 u 8.

- 5 15. Un método según la reivindicación 14, caracterizado por que la célula de roedor es una célula del tallo embrionario, en donde se introducen uno o más genes exógenos por transfección o la célula de roedor es un oocito (célula huevo), en donde los uno o más genes exógenos se introducen por microinyección de DNA.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, caracterizado por que los uno o más genes exógenos se insertan en el genoma del roedor o la célula de roedor.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado por que el roedor modificado genéticamente es un ratón, en donde el gen o genes exógenos es un gen MASP-2 humano o MAp19 humano.
- 10 18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, caracterizado por que el gen o genes exógenos son un gen humano o genes humanos.
19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que los exones 10, 11, y 12 del gen MASP-2 endógeno están deletados y/o el exón 5 del gen MAp19 endógeno está deletado.
- 15 20. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente, caracterizado por que es capaz de expresar uno o más genes exógenos y por que el gen que codifica el polipéptido MASP-2 endógeno y/o el gen que codifica el polipéptido MAp19 endógeno está/están ausentes o parcialmente ausentes o desorganizados de tal manera que el polipéptido MASP-2 endógeno de roedor y/o el polipéptido MAp19 endógeno de roedor no se produce, que puede obtenerse por un método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19.
- 20 21. Un método para producción de un anticuerpo dirigido contra una proteína MASP-2 humana y/o una proteína MAp19 humana, que comprende administrar una proteína MASP-2 humana y/o una proteína MAp19 humana a un roedor respectivo modificado genéticamente según la reivindicación 1 ó 20.
22. El método de la reivindicación 21, en donde el roedor modificado genéticamente es un ratón.
23. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el exón 5 del gen MASP-2 endógeno está deletado.
- 25 24. Un roedor o célula de roedor modificado(a) genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que carece de una respuesta de la vía del complemento de lectina.



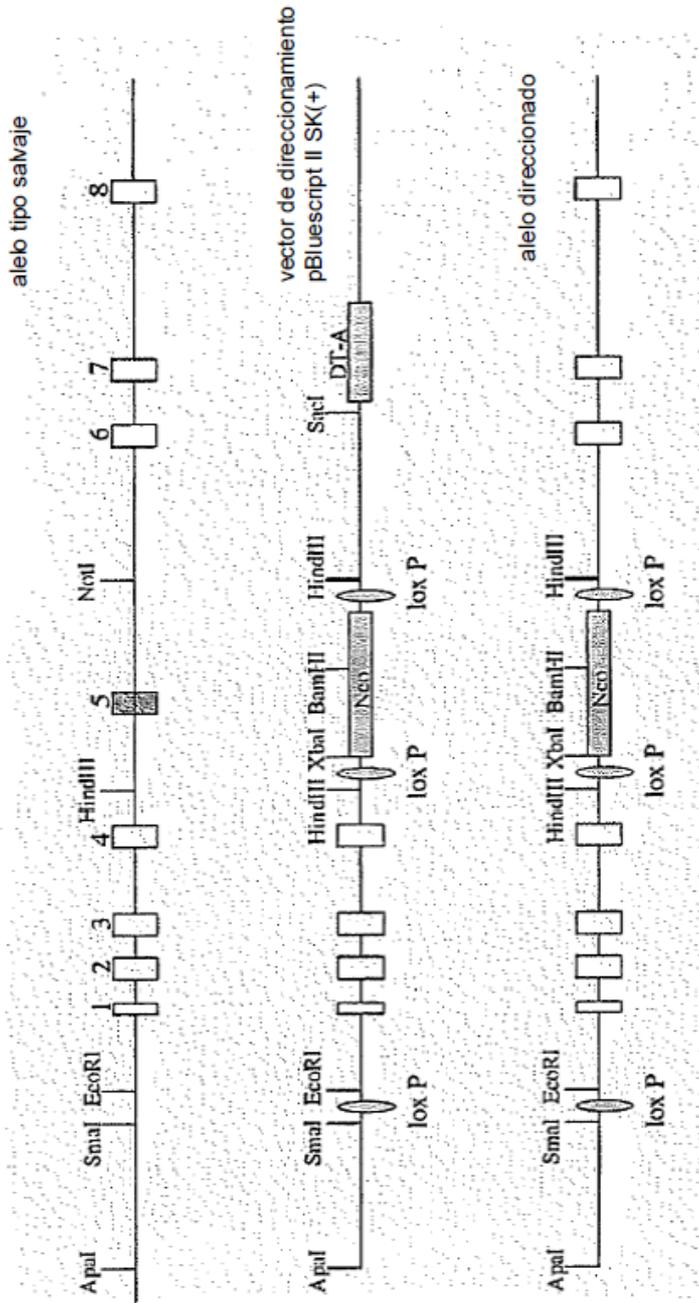
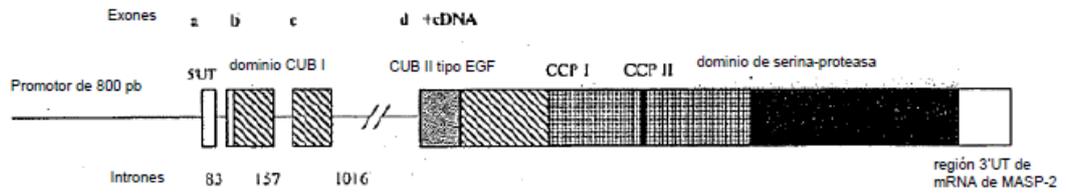


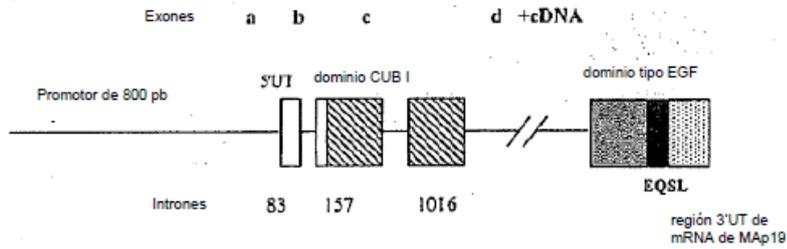
Figura 2. Construido loxP para desorganizar el exón 5 del gen MASP2 murino



A. Constructo de minigén específico de MASP-2 humano



B. Constructo de minigén específico de Map19 humano



**Figura 4:** Constructos de minigén específicos de MASP-2 y Map19/sMAP humanos para expresión transgénica de MASP-2 humano o Map19/sMAP humano.

Figura 5: La deficiencia de MASP-2 conduce a la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de lectina

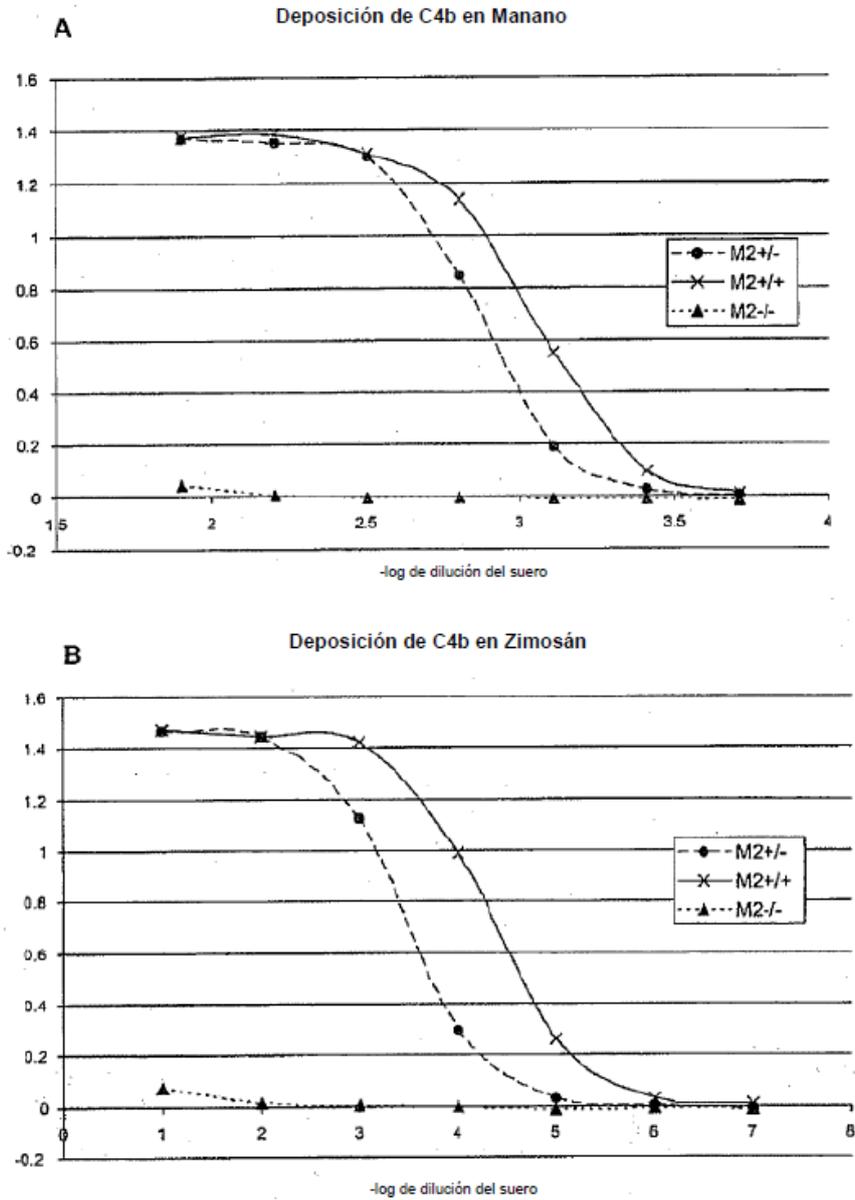


Figura 6.

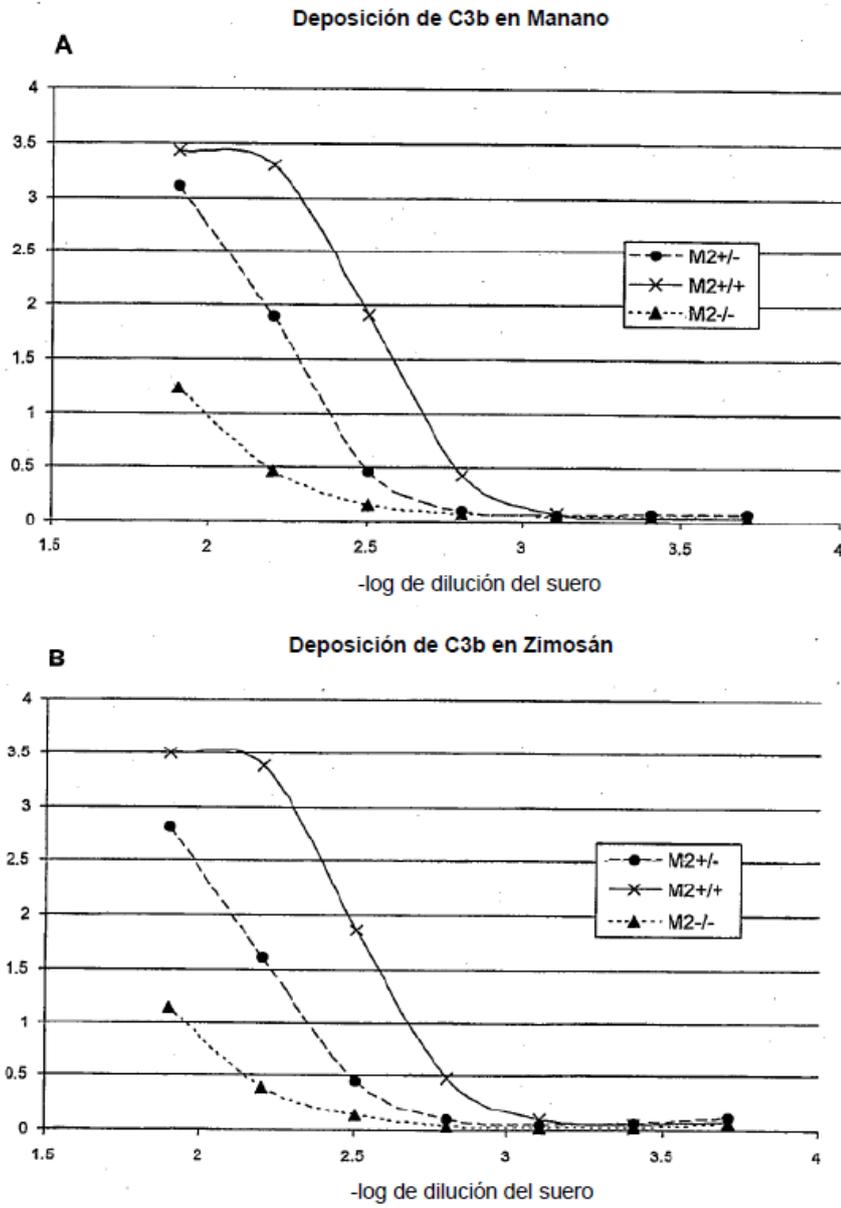


Figura 7: La deficiencia de MAp19 conduce a la pérdida de la activación de C4 mediada por la vía de lectina

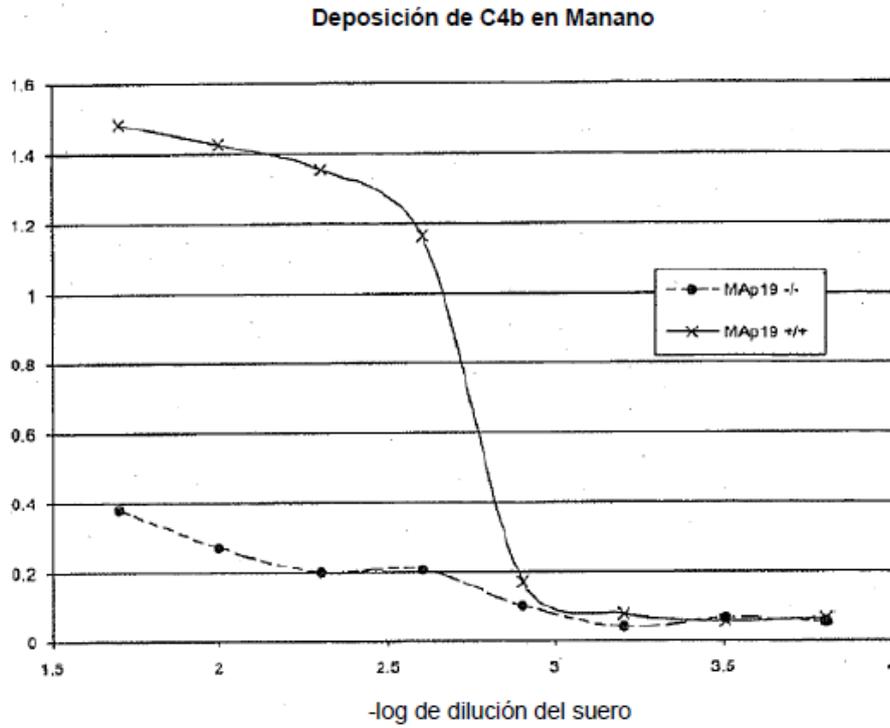


Figura 8.

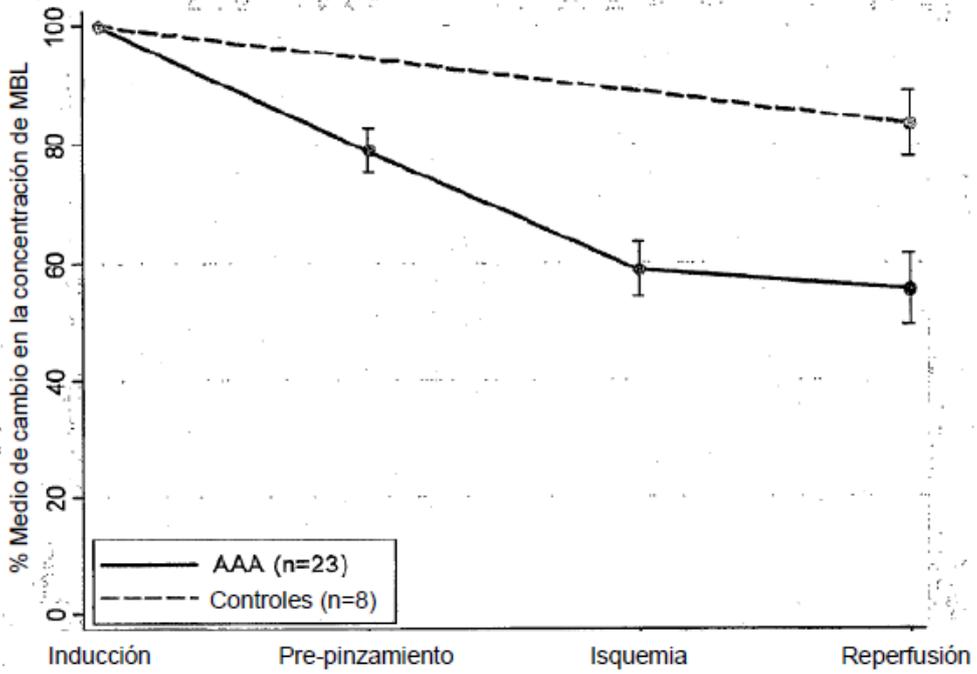


Figura 9.

Vía Clásica

Vía de Lectina

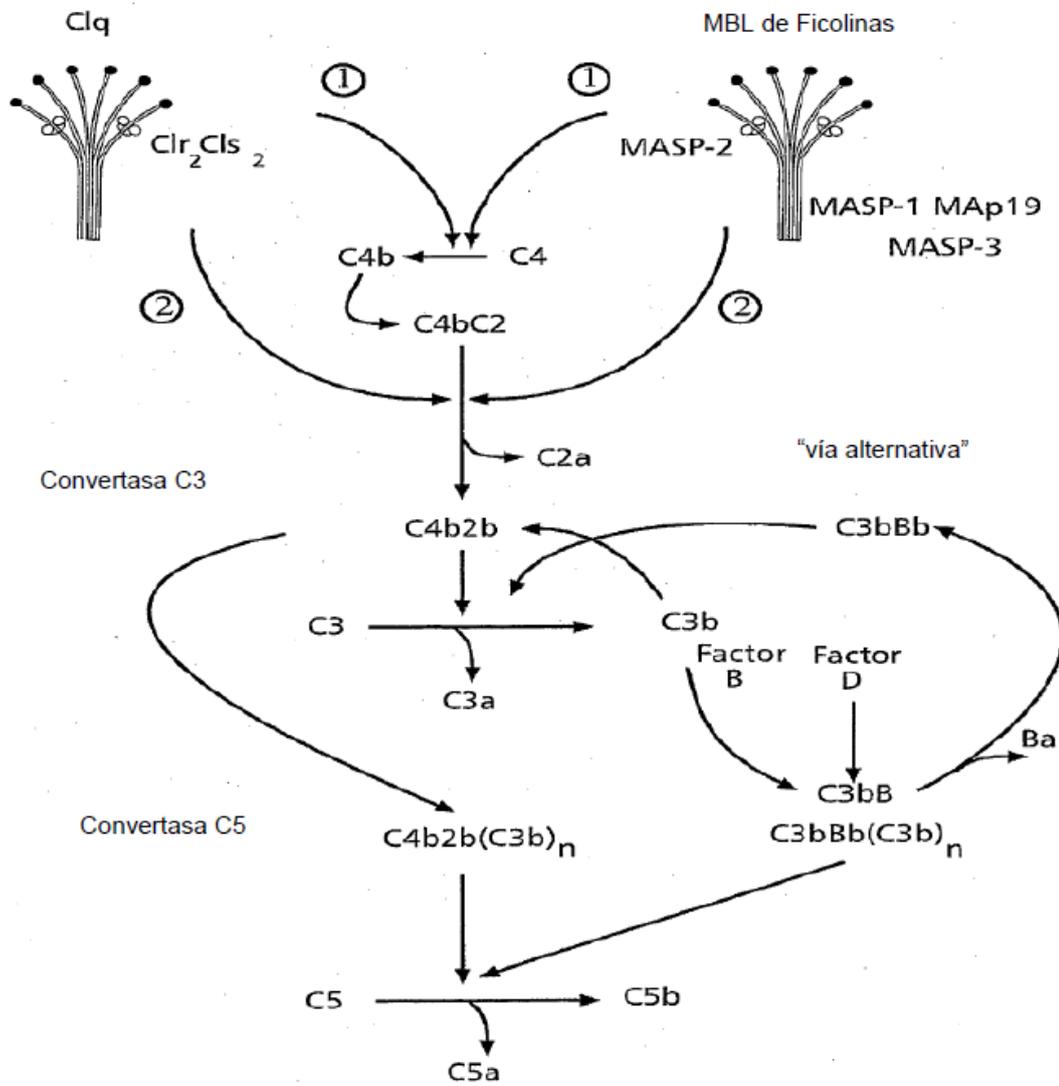


Figura 10: Secuencia de DNA del constructo de minigén MASP-2

ccggacgtgg	tggcgcatgc	ctgtaatccc	agctactcgg	gaggctgagg	caggagaatt	60
gctcgaaccc	cggaggcaga	ggtttgggtg	ctcacacctg	taatcccagc	actttgcgag	120
gctgaggcag	gtgcatcgct	ttggctcagg	agtccaagac	cagcctgggc	aacacagggg	180
gacccccatc	tctacaaaaa	acaaaaacaa	atataaaggg	gataaaaaaa	aaaaaaagac	240
aagacatgaa	tccatgaggg	cagagtgtgg	aagaggaagc	agcagcctca	aagttctgga	300
agctggaaga	acagataaac	aggtgtgaaa	taactgcctg	gaaagcaact	tctttttttt	360
tttttttttt	tttgagggtg	agctcactc	tgtcgtccag	gctggagtgc	agtggtgcga	420
tctcggatca	ctgcaacctc	cgcctcccag	gctcaagcaa	ttctcctgcc	tcagcctccc	480
gagttagctgg	gattataagt	gcgcgctgcc	acacctggat	gatttttcta	tttttagtag	540
agatgggatt	tcacctagt	ggtcaggctg	gtctcaaac	cccaacctcg	tgatccaccc	600
accttggcct	ccccaaagt	tgggattaca	ggtataagcc	accgagccca	gccaaaagcg	660
acttctaagc	ctgcaagggg	atcgggaatt	ggtggcacea	ggtcctctct	acagggttta	720
agaaattagc	cagcctgagg	ctgggcacgg	tggctcacac	ctgtaatccc	agcactttgg	780
gagcctaagc	caggtggatc	accctgaggg	aggagtcca	gaccagcctg	accaacatgg	840
agaaacccca	tcctaccaca	aaataaaaaa	ttagccaggt	gtggtggtgc	tcgctgtaa	900
tcccagctac	ttgggaggct	gaggtgggag	gatttgctga	acacaggaag	tagaggctgc	960
agttagctat	gattgcagca	ctgcaactgaa	gccggggcaa	cagaacaaga	tccaaaaaaa	1020
agggaggggt	gaggggcaga	gccaggattt	gtttccaggc	tggtgtacc	taggtccgac	1080
tctctggctcc	cagagcagcc	tgctcctgct	gctggaact	ctgagcaggc	tggagtcatg	1140
gagtgcattc	ccagaatccc	agagtcaagg	aggctggggg	caggggcagg	tcactggaca	1200
aacagatcaa	aggtgagacc	agcgtagggc	tcagaccag	gccagggcag	ctggacgggc	1260
acaccatgag	gtaggtgggc	gccccagacc	tcctgcagg	gtgtggggtg	ggagcacagg	1320
cctgggcccct	caccgcccct	gccctgccc	taggctgctg	accctcctgg	gcctctctgt	1380
tggtcgggtg	gccaccccct	tgggcccga	gtggcctgaa	cctgtgtctg	ggcgcctggc	1440
atccccgggc	tttccagggg	agtatgcca	tgaccaggag	cggcgcctga	ccctgactgc	1500
acccccgggc	taccgcctgc	gcctctactt	cacccacttc	gacctggagc	tctcccacct	1560
ctgcgagtac	gacttcgtca	aggtgccgtc	aggacgggag	ggctgggggt	tctcagggtc	1620
gggggggtccc	caaggagtag	ccagggttca	gggacacctg	ggagcagggg	ccaggcttgg	1680
ccaggagggg	gatcaggcct	gggtcttgcc	ttcactccct	gtgacacctg	accccaagc	1740
tgagctcggg	ggccaagggt	ctggccaagc	tgtgcccggc	ggagagcaca	gacacgggag	1800
gggcccctgg	caaggacact	ttctactcgc	tgggctccag	cctggacatt	accttccgct	1860
ccgactactc	caacgagaag	ccgttcacgg	ggttcgaggc	cttctatgca	gccgagggtg	1920
agccaagagg	ggtcctgcaa	catctcagtc	tcgagcagct	gctgtggggg	taactctgtc	1980
ttaggccagg	cagccctgcc	ttcagtttcc	ccacctttcc	cagggcaggg	gagagcctc	2040
tggcctgaca	tcatecaaaa	tgcaaaagacc	aaaacagccg	tgacctccat	tcacatgggc	2100
tgagtgccaa	ctctgagcca	gggatctgag	gacagcatcg	cctcaagtga	cgcagggact	2160
ggccggggcgc	agcagctcac	gcctgtaatt	ccagcacttt	gggaggccga	ggctggctga	2220
tcatttgagg	tcaggagttc	aaggccagcc	agggcaacac	ggtgaaactc	tatctccact	2280
aaaaactaaa	aaattagctg	ggcgtgggtg	tgcgcacctg	gaateccagc	tactagggag	2340
gctgaggcag	gagaattgct	tgaacctgcy	aggtggaggc	tgcaagtgaac	agagattgca	2400
ccactacact	ccagcctggg	cgacagagct	agactccgtc	tcaaaaaaca	aaaaacaaaa	2460
acgagcaggg	ggccgagggc	cccatttaca	gctgacaaa	tggggcccctg	ccagcgggag	2520
cgctgccagg	atgtttgatt	tcagatoccca	gtccctgcag	agaaccaactg	tgtagcctct	2580
ggcaagtggc	tcaatttctc	tgctccttag	gaagctgctg	caaggggtca	gcgctgtagc	2640
cccgcctcct	gggtttgatt	gactcccctc	attagctggg	tgacctcggg	ccggacactg	2700
aaactcccac	tggtttaaca	gaggtgatgt	ttgcactctt	ctcccagcgc	tgtggggagc	2760
ttgcagcgac	cctaggcctg	taaggtgatt	ggcccggcac	cagtcccgc	ccctagacag	2820
gacgagccct	cctctgaggt	ccactctgag	gtcatggatc	tcctgggagg	agtccaggct	2880
ggatcccgc	tctttcccct	ctgaeggcct	gcctggcccct	gcctctcccc	cagacattga	2940
cgagtcccag	gtggccc					2957



Figura 11: Secuencia de DNA del constructo de minigén Map19

cgggacgtgg	tggcgcatgc	ctgtaatccc	agctactcgg	gaggctgagg	caggagaatt	60
gctcgaaccc	cggaggcaga	ggtttgggtg	ctcacacctg	taatcccagc	actttgcgag	120
gctgaggcag	gtgcatcgct	ttggctcagg	agttcaagac	cagcctgggc	aacacaggga	180
gacccccatc	tctacaaaaa	acaaaaacaa	atataaaggg	gataaaaaaa	aaaaaaagac	240
aagacatgaa	tccatgagga	cagagtgtgg	aagaggaagc	agcagcctca	aagttctgga	300
agctgggaaga	acagataaac	aggtgtgaaa	taactgcctg	gaaagcaact	tctttttttt	360
tttttttttt	tttgaggtgg	agtetcaetc	tgtcgtccag	getggagtgc	agtggtgcca	420
tctcggatca	ctgcaacctc	cgctcccag	gctcaagcaa	ttctcctgcc	tcagcctccc	480
gagtagctgg	gattataagt	gogogctgoc	acacctggat	gatttttgta	tttttagtag	540
agatgggatt	tcaccatggt	ggtcaggctg	gtctcaaaact	cccaacctcg	tgatccaccc	600
accttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggtataagcc	accagagcca	gccaaaagcg	660
tccctctaac	ctgcaaggga	atcgggaatt	ggtggcacca	ggctcctctg	acagggttta	720
agaaattagc	cagcctgagg	ctgggcaagg	tggctcacac	ctgtaatccc	agcactttgg	780
gaggctaaag	cagggtggatc	acctgagggc	aggagttaa	gaccagcctg	accaacatgg	840
agaaacccca	tccctaccaa	aaataaaaaa	ttagccaggt	gtggtgggtg	tcgctgttaa	900
tccagactac	ttgggaggct	gaggtgggag	gattgcttga	acacaggaag	tagaggctgc	960
agtgagctat	gattgcagca	ctgcactgaa	gccggggcaa	cagaacaaga	tccaaaaaaa	1020
agggaggggt	gaggggcaga	gccaggattt	gttccaggc	tggtgttacc	taggtccgac	1080
tcctggctcc	cagagcagcc	tgtcctgctc	gcctggaact	ctgagcaggc	tggagtcatg	1140
gagtcgattc	ccagaatccc	agagtcaggg	aggctggggg	caggggcagg	tcactggaca	1200
aacagatcaa	aggtgagacc	agcgtagggc	tgcagaccag	gccgggccag	ctggacgggc	1260
acacctagag	gtaggtgggc	gcccacagcc	tccttcagag	gtgtgggggtg	ggagcacagg	1320
cctgggcctc	caccgcccct	gccttgcaca	taggctgtctg	acctcctctg	gccttctgtg	1380
tggctcgggtg	gccaccccct	tgggcccga	gtggcctgaa	cctgtgtctg	ggcgcctggc	1440
atcccctggc	ttccagggg	agtatgccaa	tgaccaggag	cggcgtctga	ccctgactgc	1500
accccctggc	taccgctctg	gcctctactt	caccacactc	gacctggagc	tctcccactc	1560
ctgcgagtag	gacttcgtca	aggtgccctc	aggacgggag	ggctgggggt	tctcaggggtc	1620
gggggggtccc	caaggagtag	ccagggttca	gggacacctg	ggagcagggg	ccaggcttgg	1680
ccaggagggga	gatcaggcct	gggtcctgcc	ttcactcctc	gtgacacctg	accccacagc	1740
tgagctcggg	ggccaagggtg	ctggccacgc	tgtcggggca	ggagagcaca	gacacggagc	1800
gggcccctgg	caaggacact	ttctactcgc	tgggctccag	cctggacatt	accttccgct	1860
ccgactactc	caacgagaag	ccgttcacgg	ggttcgaggc	cttctatgca	gccgaggggtg	1920
agccaagagg	ggtcctgcaa	catctcagtc	tgcgagctg	gctgtggggg	taactctgtc	1980
ttaggccagg	cagccctgcc	ttcagtttcc	ccaccttccc	cagggcaggg	gagaggcctc	2040
tggcctgaca	tcatecaaaa	tgcaaaagacc	aaaaagccg	tgacctccat	tcacatgggc	2100
tgagtgccaa	ctctgagcca	gggatctgag	gacagcatcg	cctcaagtga	cgcaggggact	2160
ggcggggcgc	agcagctcac	gcctgtaatt	ccagcacttt	gggagggcca	ggetggctga	2220
tcatttgagg	tcaggagtcc	aaggccagcc	agggcaaac	ggtgaaactc	tatctccact	2280
aaaactacaa	aaattagctg	ggcgtgggtg	tgcgcacctg	gaatcccagc	tactagggag	2340
gctgagggcag	gagaattgct	tgaacctgctg	aggtggaggc	tgcagtgaac	agagattgca	2400
ccactacact	ccagcctggg	cgacagagct	agactccgtc	tcaaaaaaca	aaaaacaaaa	2460
acgacgcagg	ggccgagggc	cccatttaca	gctgacaaaag	tggggccctg	ccagcgggag	2520
cgtgcccagg	atgtttgatt	tcagatccca	gtccctgcag	agaccaaactg	tgtgacctct	2580
ggcaagtggc	tcaatttctc	tgtcctctag	gaagctgctg	caagggttca	gcgctgtagc	2640
ccgcgccctc	gggtttgatt	gactcccctc	attagctggg	tgacctgggg	ccggacactg	2700
aaactcccac	tggtttaaca	gaggtgatgt	ttgcatcttt	ctcccagcgc	tgctgggagc	2760
ttgcagcgac	cctaggcctg	taaggtgatt	ggcccggcac	cagtcoccca	ccctagacag	2820
gacgagggcct	cctctgaggt	ccactctgag	gtcatggatc	tcctggggag	agtccaggct	2880
ggateccgcc	tctttccctc	ctgaecggct	gcctggccct	gcctctcccc	cagacattga	2940
cgagtgccag	gtggccc					2957

La secuencia genómica humana del gen *MASP-2* (arriba) se fusiona al extremo 5' de nuestro cDNA de *MAp19* (abajo) utilizando un sitio *Xma I* (CC/CGGG)

```

100                               110                               120
.....CGGGAGAGGGCGCCACCTGCGACCACCCTGCCACAACCACCTGGGCGGTTC
I D E C Q V A P G E A P T C D H H C H N H L G G F
130                               140
TACTGCTCCTGCCCGCAGGCTACGTCCTGCACCGTAACTAGCGCACCTGCTCAGAGCAGAGCCTCTAGcctccc
Y C S C R A G Y V L H R N K R T C S E Q S L parada
150                               160                               170
ctggagctccggctgcccagcaggtcagaagccagagccagcctgctggcctcagctccgggttgggctgagatg
ctgtgccccaaactcccattcaccaccatggaccaataataaacctggccccacccccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

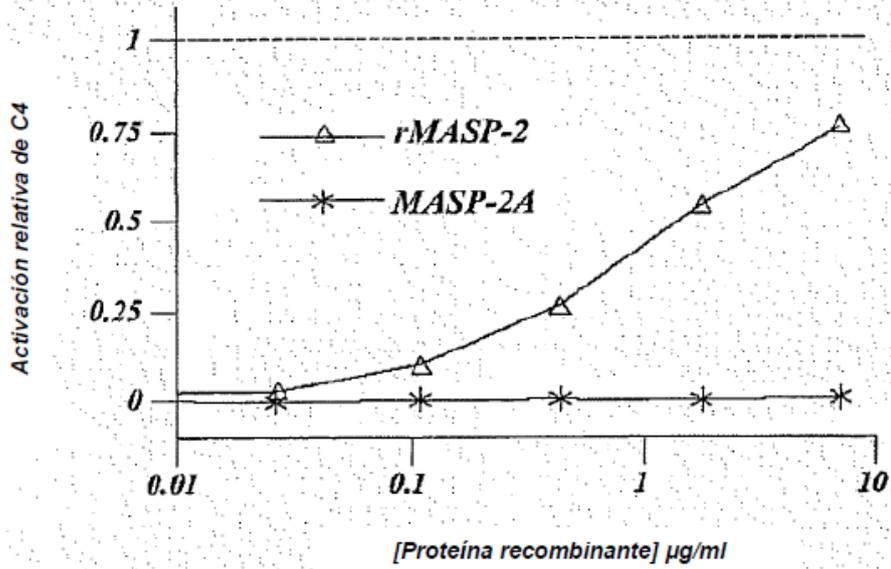


Fig.12.

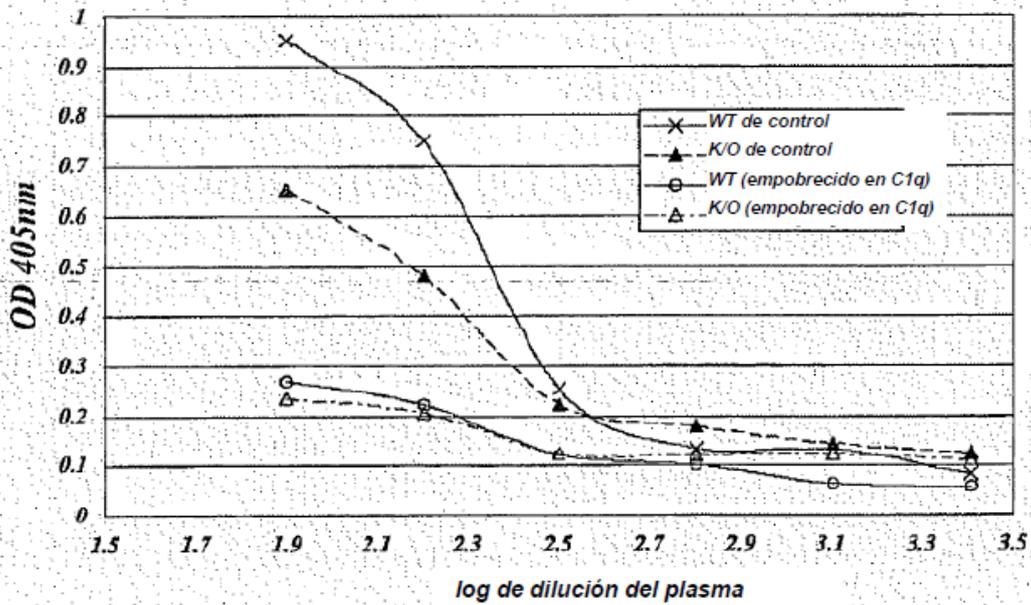


Fig.13.